

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Chemische Synthese und Evaluierung von 2'3'-cGAMP-Analoga

Clemens Reto Dialer

aus

München, Deutschland

2020

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 12.05.2020

Clemens Reto Dialer

Dissertation eingereicht am:

12.05.2020

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell

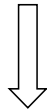
2. Gutachterin: Dr. Stefanie Kellner

Mündliche Prüfung am:

22.06.2020

„Lebe als würdest du morgen sterben. Lerne als würdest du für immer leben.“

– Mahatma Gandhi –



cleMens sana in corpore sano

Für meine Familie

Teile dieser Arbeit wurden in *Chemistry – A European Journal* und auf Fachkonferenzen publiziert:

Publikationen während der Dissertation

A Click-Chemistry Linked 2'3'-cGAMP Analogue

Clemens Dialer, Samuele Stazzoni, David Drexler, Felix Müller, Simon Veth, Alexander Pichler, Hidenori Okamura, Gregor Witte, Karl-Peter Hopfner, Thomas Carell*

Chem. Eur. J. **2019**, 25, 2089-2095.

Highlighted by Prof. Dirk Trauner in *Synfacts* **2019**, 15, 0434.

Weitere Publikationen

Synthesis of Lamellarin G Trimethyl Ether by Miller–Plöchl-Type Cyclocondensation

Vanessa Colligs, Clemens Dialer, Till Opatz* *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 4064-4070.

Diastereodivergent Synthesis of Fluorinated Cyclic β^3 -Amino Acid Derivatives

Isabel Aparici, Marta Guerola, Clemens Dialer, Antonio Simón-Fuentes, María Sánchez-Roselló, Carlos del Pozo, Santos Fustero* *Org. Lett.* **2015**, 17, 5412-5415.

Synthesis of Lamellarin D Trimethyl Ether and Lamellarin H via 6π -Electrocyclization

Clemens Dialer, Dennis Imbri, Steven Peter Hansen, Till Opatz* *J. Org. Chem.* **2015**, 80, 11605-11610

Konferenzbeiträge

- 2019 Nucleic Acids and Innate Immunity (Locarno, Schweiz). Vortrag: *“Design of 2’3’-cGAMP Analogues”*
- 2019 21st European Symposium on Organic Chemistry (Wien, Österreich). Posterpräsentation: *“A Click-Chemistry Linked 2’3’-cGAMP Analogue”*
- 2019 Life Science Symposium (Mainz). Vortrag: *“Design of 2’3’-cGAMP Analogues”*
- 2019 2nd PSL Chemical Biology Symposium (Paris, Frankreich). Posterpräsentation: *“A Click-Chemistry Linked 2’3’-cGAMP Analogue”*
- 2018 Physical-Organic Chemistry at its Best: The Art of Chemical Problem Solving (Halle). Posterpräsentation: *“Design of a Neutral Cyclophane Analogue of the Second Messenger 2’,3’-Cyclic Guanosine Monophosphate Adenosine Monophosphate (cGAMP)”*
- 2018 XXIIIth International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (San Diego, USA). Posterpräsentation: *“Design of a Neutral Cyclophane Analogue of the Second Messenger 2’,3’-Cyclic Guanosine Monophosphate Adenosine Monophosphate (cGAMP)”*
- 2018 52nd European Symposium on Biological and Organic Chemistry (GREGYNOG, Wales). Posterpräsentation: *“Design of a Neutral Cyclophane Analogue of the Second Messenger 2’,3’-Cyclic Guanosine Monophosphate Adenosine Monophosphate (cGAMP)”*
- 2018 SFB-Meeting 1032 Nano Agents (München). Vortrag: *“Design of 2’3’-cGAMP Analogues”*

Danksagungen

Ich bedanke mich an erster Stelle bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Carell. Die Promotionszeit habe ich als eine der bisher prägendsten Zeiten meines Lebens erlebt, menschlich sowie wissenschaftlich. Durch Dich, lieber Thomas, habe ich gelernt das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren, meine chemischen Ansätze stetig zu hinterfragen und Rückschläge in Kauf zu nehmen. Du hast mir ein Forschungsumfeld geschaffen, in dem ich selbst Verantwortung übernehmen konnte und meine Ideen nicht als utopisch abgetan wurden – auch wenn sie oft scheitern sollten. Du hast Vertrauen in mich gesetzt, wenn es aussichtslos schien und mich herausgefordert, wenn mein theoretisches Modell wackelte. Ich schätze Dich für deinen Mut in der Forschung unkonventionelle und kreative Wege zu gehen und habe mich stets gerne an Dir orientiert. Danke für die tolle Chance bei Dir im Arbeitskreis und die fruchtbare Entwicklung, die ich unter Deiner Leitung erfahren durfte.

Ich danke Dr. Stefanie Kellner für die Übernahme des Koreferats. Unsere zahlreichen Diskussionen haben mir neue Perspektiven aufgezeigt und mich ermutigt mich in unbekanntes Terrain einzulesen. Vielen Dank für Deine aufmerksame und empathische Unterstützung.

Allen weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission bestehend aus Prof. Dr. Oliver Trapp, Prof. Dr. Karaghiosoff, Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner und Dr. Sabine Schneider danke ich herzlich für ihre Mitwirkung an meiner Doktorprüfung.

Frau Slava Gärtner danke ich für ihre organisatorische Unterstützung und Hilfsbereitschaft während der kompletten Promotionszeit. Ich habe Ihren Weihnachtsstollen außerdem sehr genossen.

Ich danke Dr. Markus Müller als maßgebliche Stütze unserer Forschungsgruppe. Ich bewundere Deinen kritischen Blick und Deine schnelle Auffassungsgabe. Diese unverzichtbaren Eigenschaften haben mich angespornt mein Projekt von verschiedensten Seiten zu beleuchten und mich immer wieder außerhalb meiner Komfortzone zu bewegen. Ich schätze Dich für Deine Strukturiertheit und bin Dir dankbar für das Aufrechterhalten des Laboralltags. Dadurch hast du mir in unzähligen Situationen den Rücken freigehalten. Ich nehme viel von Deinem Vorbild und Einsatz für andere Menschen mit.

Über die Jahre hat sich eine wunderbare subgroup rund um das cGAMP-Molekül gebildet bestehend aus Samuele Stazzoni, Simon Veth, Fabian Hernichel, Katerina Pappa, Johann de Graaf und Giacomo Ganazzoli. Ich möchte mich insbesondere bei Samuele und Simon für die unerschütterliche Begeisterung und Frustrationstoleranz bedanken, die uns gemeinsam durch dieses Forschungsgebiet getragen haben. Ihr habt mich äußerst motiviert an das Gelingen unserer Strategien zu glauben. Ihr habt unzählige Geistesblitze gehabt, um die vielen Herausforderungen zu meistern. Zusätzlich habe Ich mich riesig gefreut, dass wir zusammen auf der Konferenz in Locarno waren und die führenden Wissenschaftler der Szene kennenlernen konnten. Ein herzliches Dankeschön an Euch!

Außerdem möchte ich in dem Zusammenhang Dr. David Drexler, PD Dr. Gregor Witte und Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner vom Department Biochemie (LMU) für die zuverlässige und inspirierende Kooperation danken. Es waren letztlich Deine Messungen und Dein unermüdlicher Einsatz, David, die uns an der Entwicklung von cGAMP-Derivaten wachsen ließen.

Ich danke Dr. Hidenori Okamura, der mich als Laborpartner vor allem in meiner Anfangszeit stark unterstützt hat und mir ein lieber Freund geworden ist. Ich mochte wie klar und deutlich Du über Chemie sprechen konntest.

Ich danke Jonas Feldmann, Hides Laborplatznachfolger, für seine kontinuierliche Hilfsbereitschaft und Freude an der Forschung. Dein Interesse und Wissen fand ich sehr schön.

Ich danke meinen Praktikanten Felix Müller, Alexander Pichler, Niklas Schneider, Florian Engelsberger und Julian Hofstädter für die produktive Zusammenarbeit im Labor F4.012. Mit Euch konnte ich die cGAMP-Chemie immer wieder neu entdecken und ich schätze Euch für Eure Motivation und Energie. Vor allem Felix fühle ich mich sehr verbunden aufgrund seiner langjährigen und inspirierenden Mitarbeit, die schließlich in einer Promotion im AK Carell führte. Ich danke Dir für Deine exzellenten Einfälle und Deine kooperative Arbeitsweise. Ich konnte viel von Dir lernen.

Ich danke Kerstin Kurz für ihre zuverlässige und zugewandte Hilfe rund um den Laboralltag.

Großer Dank geht auch an Eva Korytiaková. Deine Herzenswärme und Einfühlungsvermögen haben mich beseelt. Außerdem bist Du eine wirklich außergewöhnliche Chemikerin. Wie schön, dass wir so einen wichtigen Lebensabschnitt geteilt und die ESOC-Konferenz in Wien zusammen erlebt haben.

Ein besonderer Dank geht an alle Korrekturleser wie Simon Veth, Jonas Feldmann, Dr. David Drexler und Dr. Markus Müller. Außerdem an die gesamte Forschungsgruppe Carell, mit der ich eine wunderbare Zeit verbracht habe.

Ich freue mich sehr über meinen Kommilitonen und loyalen Freund Leo Diehl, der mich seit dem ersten Tag des Studiums begleitet hat und nun zeitgleich mit seiner Promotion in anorganischer Chemie fertig wird. Unsere gemeinsamen Mittagessen behalte ich in schönster Erinnerung. Deine extravaganen Visionen und Gedanken beflügeln mich! Ich schätze Dich für Dein tiefes Verständnis.

Ich danke Benedikt Goretzki für die gemeinsame Zeit im Masterstudium in Mainz und das gegenseitige Protokollieren unseres Werdegangs. Ich habe die kritischen Diskussionen mit dir über biochemische Themen sehr genossen und profitiere von Deinen Eingebungen und Deiner Vorstellungskraft. Wie schön, dass du auch zeitgleich fertig wirst mit deiner Dissertation.

Ich danke meinem jüngeren Bruder Marwin Dialer, mit dem mich so vieles verbindet und der auch seine Doktorarbeit am Campus in Großhadern schreibt. Ich bin bewegt, dass wir diesen Pfad gemeinsam gehen. Ich schätze Dich für Deine Aufmerksamkeit, Zeit und Nähe.

Ich danke meinen Eltern für die Unterstützung und Liebe während meines Studiums und anschließender Promotion. Es war Eure Botschaft an mich zu glauben, die mich durchhalten ließ. Außerdem danke ich meinen Geschwistern Corinne, Marwin und Lennart für die wertvolle Begleitung.

Zuletzt danke ich der Rosa-Luxemburg-Stiftung für ein Promotionsstipendium. Insbesondere die menschliche und vertrauenswürdige Unterstützung von Dr. Sandra Thieme, Juliane Kretschmer und Dr. Marcus Hawel möchte ich hervorheben.

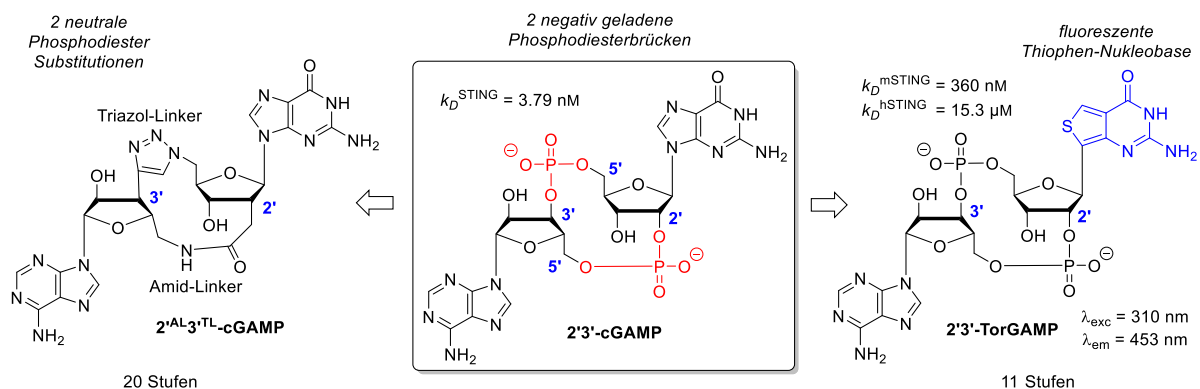
Zusammenfassung

Der *second messenger* 2'3'-cGAMP besteht aus einer außergewöhnlich verknüpften Adenosin- und Guanosinmonophosphat Einheit. Eine nicht-kanonische 2'-5'- und eine kanonische 3'-5'-Phosphodiesterbindung bilden den 13-gliedrigen Makrozyklus. Innerhalb der Zelle nimmt dieses zyklische Dinukleotid eine entscheidende Schlüsselfunktion ein, um die angeborene Immunantwort über die cGAS-STING-Achse zu steuern. Diese Signalkaskade wird durch das Auftreten von doppelsträngiger DNA im Zytosol ausgelöst, z.B. während Infektionen oder Zell-Gleichgewichtsstörungen. Dem Immunotransmitter 2'3'-cGAMP wird ein immenses therapeutisches Potenzial attestiert, um die cGAS-STING-Achse in Immunzellen zu modulieren. Denn es besteht die Hoffnung, dass degenerierte Zellen eines Organismus selektiv und schonend aussortiert werden können (z.B. bei Krebszellen) – anders als bei Chemotherapien, die mit starken Nebenwirkungen verbunden sind.

Die pharmakokinetischen Eigenschaften von 2'3'-cGAMP sind allerdings nicht ausreichend, um die Anforderungen eines potenten Arzneimittels zu erfüllen. Grund dafür ist unter anderem die Natur der zwei negativ geladenen Phosphodiesterbindungen und der damit einhergehenden schlechten Penetration der Zellmembran.

In der vorliegenden Dissertation wurde ein neutral geladenes 2'3'-cGAMP-Analogon über 20 Stufen im 100 mg-Maßstab synthetisiert mit mutmaßlich verbesserter Membranpermeation. Der Zyklus wurde durch einen Triazol- und Amid-Linker verbrückt. Dadurch wurde ein synthetischer Zugang zu neutralen Nukleosid-Cyclophanen geschaffen. Eine Ligandenbindung mit STING konnte nicht detektiert werden und die inhibitorischen Effekte auf cGAS besaßen *in vitro* Optimierungsbedarf.

In einem weiteren Ansatz wurde ein fluoreszierendes Analogon mit einer modifizierten Thiophen-Nukleobase in 11 Stufen konstruiert. Dieses sollte das Studium der STING-Mikroumgebung in Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität, neue Ligandenverdrängungsassays oder bildgebende Mikroskopieverfahren ermöglichen. Während das sogenannte 2'3'-TorGAMP an murines STING eine nanomolare Bindung zeigte, erforderten die Bindungsinteraktionen mit humanem STING noch strukturelle Weiterentwicklungen (mikromolare Bindung). Mit den unten dargestellten cGAMP-Analoga konnten die sensiblen STING-Interaktionen untersucht werden.



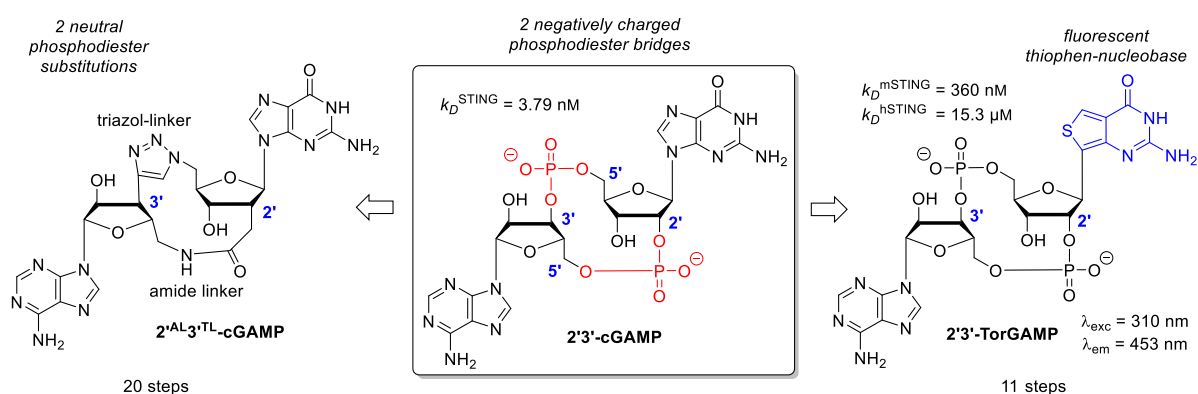
Summary

The second messenger 2'3'-cGAMP consists of an unusually connected adenosine and guanosine monophosphate unit. The 13-membered macrocycle is composed of a non-canonical 2'-5' and a canonical 3'-5' phosphodiester bond. Within the cell, this cyclic dinucleotide holds key functions by controlling the innate immune response via the cGAS-STING axis. During infections or disruptions of the cell's homeostasis the cGAS-STING signaling cascade is triggered by the occurrence of double stranded DNA in the cytosol. It is believed that the immunotransmitter 2'3'-cGAMP possesses remarkable therapeutic potentials because it is able to tune the cGAS-STING pathway in immune cells. On account of this, there is hope to eliminate degenerated cells under selective and mild conditions (e.g. cancer cells) – in contrast to chemotherapies which feature severe side effects.

The pharmacokinetic properties of 2'3'-cGAMP, however, are not sufficient to meet the requirements of a potent and modern drug. One of the reasons are the two negatively charged phosphodiester bridges and their resulting poor penetrability of the cell membrane.

Here, a neutrally charged 2'3'-cGAMP analogue was synthesized on a 100 mg scale over 20 steps with potentially better membrane crossing characteristics. The cycle was linked by a triazol- and amide connection which now provides synthetic access to neutral nucleoside cyclophanes. Further studies of the binding affinity to STING revealed no detectable binding of the ligand. The potential inhibitory effects towards cGAS *in vitro* require optimization.

A second part of this thesis was devoted to the 11-step-synthesis of a fluorescent 2'3'-cGAMP analogue containing a modified thiophen nucleobase. The fluorescent molecule was prepared in order to probe the STING microenvironment and for the development of a new ligand competition assay with the help of new cell imaging methods. While the so-called 2'3'-TorGAMP bound to murine STING in nanomolar affinity, the binding interactions with human STING still required structural modifications (micromolar binding). With these two cGAMP analogues in hand, the sensitive STING binding modes could be examined.



INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassug.....	V
Summary	VI
1. Einleitung	1
1.1. Die cGAS-STING-Achse – zentraler Player des angeborenen Immunsystems.....	1
1.2. 2'3'-cGAMP als entscheidender Modulator der zelleigenen Immunantwort	4
1.3. Krankheiten bei Störung des cGAS-STING-Gleichgewichts	6
1.4. cGAMP-Analoga – großes therapeutisches Potenzial	7
1.5. Strukturelle Einblicke in die Bindung des Moleküls DMXAA an STING	11
1.6. Substitutionsmotive von Phosphodiesterbindungen	13
1.7. Fluoreszierende Nukleotid-Analoga	18
2. Motivation.....	25
3. Syntheseplanung.....	27
3.1. Ein amidverknüpftes Monophosphat-Analogon	27
3.2. 2' ^{AL} 3' ^{TL} -cGAMP: Ein neutral geladenes 2'3'-cGAMP-Analogon	28
3.3. 2'3'-TorGAMP: Ein fluoreszierendes 2'3'-cGAMP-Analogon.....	29
4. Resultate und Diskussion	31
4.1. Synthesen zum amidverknüpften Monophosphat-Analogon	31
4.2. 2' ^{AL} 3' ^{TL} -cGAMP: Ein neutral geladenes 2'3'-cGAMP-Analogon	35
4.2.1. Synthese und Evaluierung der Bindung an STING	35
4.2.2. Inhibition von cGAS durch 2' ^{AL} 3' ^{TL} -cGAMP	43
4.2.3. 2' ^{AL} 3' ^{TL} -cGAMP-Stimulation in BLaER1 Monocyten.....	46
4.3. 2'3'-TorGAMP: Ein fluoreszierendes 2'3'-cGAMP-Analogon.....	47
4.3.1. Synthese von 2'3'-TorGAMP und 3'3'-TorGAMP	47
4.3.2. Bestimmung der Phosphodiester-Konnektivität der TorGAMP-Isomere.....	50
4.3.3. Absorption und Fluoreszenz von 2'3'-TorGAMP	52
4.3.4. Bindungsaffinität zu mSTING und hSTING.....	53

5.	Fazit	58
6.	Experimentelle Details	62
7.	Analytik.....	63
7.1.	Nuclear Magnetic Resonance Spektroskopie (NMR)	63
7.2.	Infrarot Spektroskopie (IR)	63
7.3.	Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS).....	63
8.	Experimentelle Vorschriften und Charakterisierung	64
8.1.	Syntheseansätze in Richtung eines amidverknüpften Monophosphat-Analogons von 2'3'-cGAMP	64
8.1.1.	Methyl 5- <i>O</i> -Allyl-2- <i>C</i> -carboxymethyl-2-deoxy-2,3-lacton- <i>D</i> -ribofuranosid (97)	64
8.1.2.	Methyl 5- <i>O</i> -Allyl-3- <i>O</i> -benzyl-2,5-dideoxy-2- <i>C</i> -[(benzyloxycarbonyl)methylen]- <i>D</i> -ribofuranosid (98).....	65
8.1.3.	9-[5- <i>O</i> -Allyl-3- <i>O</i> -benzyl-2,5-dideoxy-2- <i>C</i> -[(benzyloxycarbonyl)methylen]- β - <i>D</i> -ribofuranosyl]-6- <i>O</i> -(diphenylcarbamoyle)-2- <i>N</i> -isobutyrylguanin (75).....	66
8.1.4.	9-[3- <i>O</i> -benzyl-2,5-dideoxy-2- <i>C</i> -[(benzyloxycarbonyl)methylen]- β - <i>D</i> -ribofuranosyl]-6- <i>O</i> -(diphenylcarbamoyle)-2- <i>N</i> -isobutyrylguanin (99)	67
8.1.5.	9-[5- <i>O</i> -(4,4'-Dimethoxytrityl)-3- <i>O</i> -benzyl-2,5-dideoxy-2- <i>C</i> -[(benzyloxycarbonyl)methylen]- β - <i>D</i> -ribofuranosyl]-6- <i>O</i> -(diphenylcarbamoyle)-2- <i>N</i> -isobutyrylguanin (118).....	68
8.1.6.	9-[5- <i>O</i> -(4,4'-Dimethoxytrityl)-3- <i>O</i> -benzyl-2,5-dideoxy-2- <i>C</i> -carboxymethyl- β - <i>D</i> -ribofuranosyl]-6- <i>O</i> -(diphenylcarbamoyle)-2- <i>N</i> -isobutyrylguanin (119).....	69
8.1.7.	<i>N</i> 6''-Benzoyl-2'''-deoxy-5'''- <i>O</i> -(4,4'-dimethoxytrityl)-adenosin-3'''-5'- <i>O</i> , <i>O</i> -PO(OCE)-9-[3- <i>O</i> -benzyl-2,5-dideoxy-2- <i>C</i> -[(benzyloxycarbonyl)methylen]- β - <i>D</i> -ribofuranosyl]-6- <i>O</i> -(diphenylcarbamoyle)-2- <i>N</i> -isobutyrylguanin (104)	70
8.1.8.	<i>N</i> 6''-Benzoyl-2'''-deoxy-adenosin-3'''-5'- <i>O</i> , <i>O</i> -PO(OCE)-9-{3- <i>O</i> -benzyl-2,5-dideoxy-2- <i>C</i> -[(benzyloxycarbonyl)methylen]- β - <i>D</i> -ribofuranosyl]-6- <i>O</i> -(diphenylcarbamoyle)-2- <i>N</i> -isobutyrylguanin (106).....	71
8.1.9.	<i>N</i> 6-Benzoyl-5'-Benzyloxycarbonylamino-2'-deoxyadenosin (113)	72
8.1.10.	<i>N</i> 6-Benzoyl-5'-Benzyloxycarbonylamino-2'-deoxyadenosin-3'- <i>O</i> -[<i>O</i> -(2-cyanoethyl)- <i>N,N'</i> -diisopropylphosphoramidit] (115)	73
8.1.11.	<i>N</i> 6''-Benzoyl-5'''-Benzyloxycarbonylamino-2'''-deoxyadenosin-3'''-5'- <i>O</i> , <i>O</i> -PO(OCE)-9-[3- <i>O</i> -benzyl-2,5-dideoxy-2- <i>C</i> -[(benzyloxycarbonyl)methylen]- β - <i>D</i> -ribofuranosyl]-6- <i>O</i> -(diphenylcarbamoyle)-2- <i>N</i> -isobutyrylguanin (119)	74

8.2.	Synthese des amid- und triazolverknüpften Analogons 2' ^{AL} 3' ^{TL} -cGAMP.....	76
8.3.	Synthese von 2'3'-TorGAMP und 3'3'-TorGAMP	77
8.3.1.	5'-O-DMTr- <i>N</i> ² -DMF-2'-O-TBS- th guanosin (129) und 5'-O-DMTr- <i>N</i> ² -DMF-3'-O-TBS- th guanosin (128).....	77
8.3.2.	<i>N</i> ² -DMF-3'-O-PO(OallylOCE)-2'-O-TBS- th guanosin (131) und <i>N</i> ² -DMF-2'-O-PO(OallylOCE)-3'-O-TBS- th guanosin (86)	79
8.3.3.	<i>N</i> 6''-Bz-2'''-O-TBS-adenosin-3'''-5'-O,O-PO(OCE)- <i>N</i> ² -DMF-3'-O-PO(OallylOCE)-2'-O-TBS- th guanosin (133) und <i>N</i> 6''-Bz-2'''-O-TBS-adenosin'''-5'-O,O-PO(OCE)- <i>N</i> ² -DMF-2'-O-PO(OallylOCE)-3'-O-TBS- th guanosin (132)	84
8.3.4.	3'3'-c th GAMP (137) und 2'3'-c th GAMP (69)	88
9.	¹ H-/ ¹³ C-/2D-NMR Spektren	93
10.	Abkürzungen	115
11.	Literaturverzeichnis.....	120

EINLEITUNG

1. Einleitung

1.1. Die cGAS-STING-Achse – zentraler Player des angeborenen Immunsystems

Die Immunabwehr eines Organismus wird durch zwei grundsätzliche Mechanismen kontrolliert. Einerseits die angeborene Immunabwehr (z.B. dendritische Zellen, Makrophagen), die erregerspezifisch und schnell reagiert. Andererseits das adaptive Immunsystem (z.B. T-Zellen, B-Zellen), das sich erregerspezifisch und langsamer entwickelt. Beide Bereiche bedingen sich und interagieren über ein komplexes Netzwerk während der Krankheitsbekämpfung.^[1,2]

Die allererste Gefahrenabwehr von Pathogenen (z.B. Viren, Retroviren, Bakterien) bietet die menschliche Haut, das größte Organ des Körpers. Gelingt es Erregern, wie beispielsweise Viren, dennoch diese und weitere Barrieren zu durchdringen, erfolgt die Infektion der Körperzellen. Dies kann einerseits durch direkte Injektion des viralen Erbguts in das Zytoplasma passieren oder durch Phagozytose, wobei ihr Erbmateriale zunächst in Endosomen der Zellmembran eingeschlossen wird. Entscheidend ist dann, dass die infizierte Zelle zwischen körpereigenen und körperfremden Nukleinsäuren unterscheiden kann, um nicht fälschlicherweise eine Immunantwort einzuleiten.^[3] Die eingeschleuste RNA oder DNA muss dafür zwingend als *fremdes* Erregermuster (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) identifiziert werden. Hochspezialisierte Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptor*, PRR) wie Toll-like Rezeptoren helfen ihr dabei eine antivirale Immunantwort einzuleiten.^[4] Treten Nukleinsäuren jedoch direkt im Zytosol auf, werden andere Mechanismen der Alarmbereitschaft aktiviert. Während RNA durch RIG-I^[5] oder MDA5^[6] erkannt wird, spielt bei doppelsträngiger DNA die Bindung von der zyklischen Guanosinmonophosphat Adenosinmonophosphat-Synthase (cGAS) eine bedeutende Rolle.

Die angeborene Immunantwort einer Säugerzelle basiert im Fall von doppelsträngiger DNA (dsDNA) auf der cGAS-cGAMP-STING-IRF3-Signalkaskade (Abbildung 1).^[7,8] Die Zyklastase cGAS^[9] bindet selektiv an dsDNA und synthetisiert den Botenstoff 2'3'-cGAMP (**1**, zyklisches 2'3'-Guanosinmonophosphat Adenosinmonophosphat). In einem weiteren Schritt bindet 2'3'-cGAMP an das Transmembranprotein STING (*stimulator of interferon genes*, auch bekannt unter TMEM173, MITA oder ERIS). STING selbst befindet sich als offenes Homodimer am endoplasmatischen Retikulum und besteht aus 379 Aminosäuren.^[10,11] Die cGAMP-Bindung bewirkt eine Konformationsänderung dieses Protein-Ligand-Komplexes hin zu einer geschlossenen Form.

Shang et al.^[12] beschreiben, dass der STING-cGAMP-Verbund weiter zum Golgi-Apparat wandert und dort durch Palmitoylierung an Cys 88 und Cys 91 Oligomere bildet.^[13] TBK1 (*tank binding kinase 1*) aktiviert diese STING-Oligomere daraufhin durch Phosphorylierung^[14], sodass STING seinerseits den Transkriptionsfaktor IRF3 (*interferon regulatory factor 3*) rekrutieren kann, der wiederum von TBK1 phosphoryliert wird. Eine komplexe Interaktion, die den Abbau von STING zur Folge hat. Die Produktion von Typ-1-Interferonen (IFN) wird durch ein Homodimer von IRF3 im Zellkern initiiert, was die Entzündungsreaktion startet. Der ursprüngliche Erreger wird demnach zunächst erkannt und schließlich zum Schutz der Zelle abgebaut (Xenophagie).^[15,16] Ist die Bedrohung für das Überleben der Zelle zu groß, wird der kontrollierte Zelltod durch Apoptose eingeleitet.^[17,18] Abseits von viralen

Infektionen kann auch die Störung der zelleigenen Homöostase und Freisetzung von eigener DNA zu einem ähnlichen Ereignis führen.

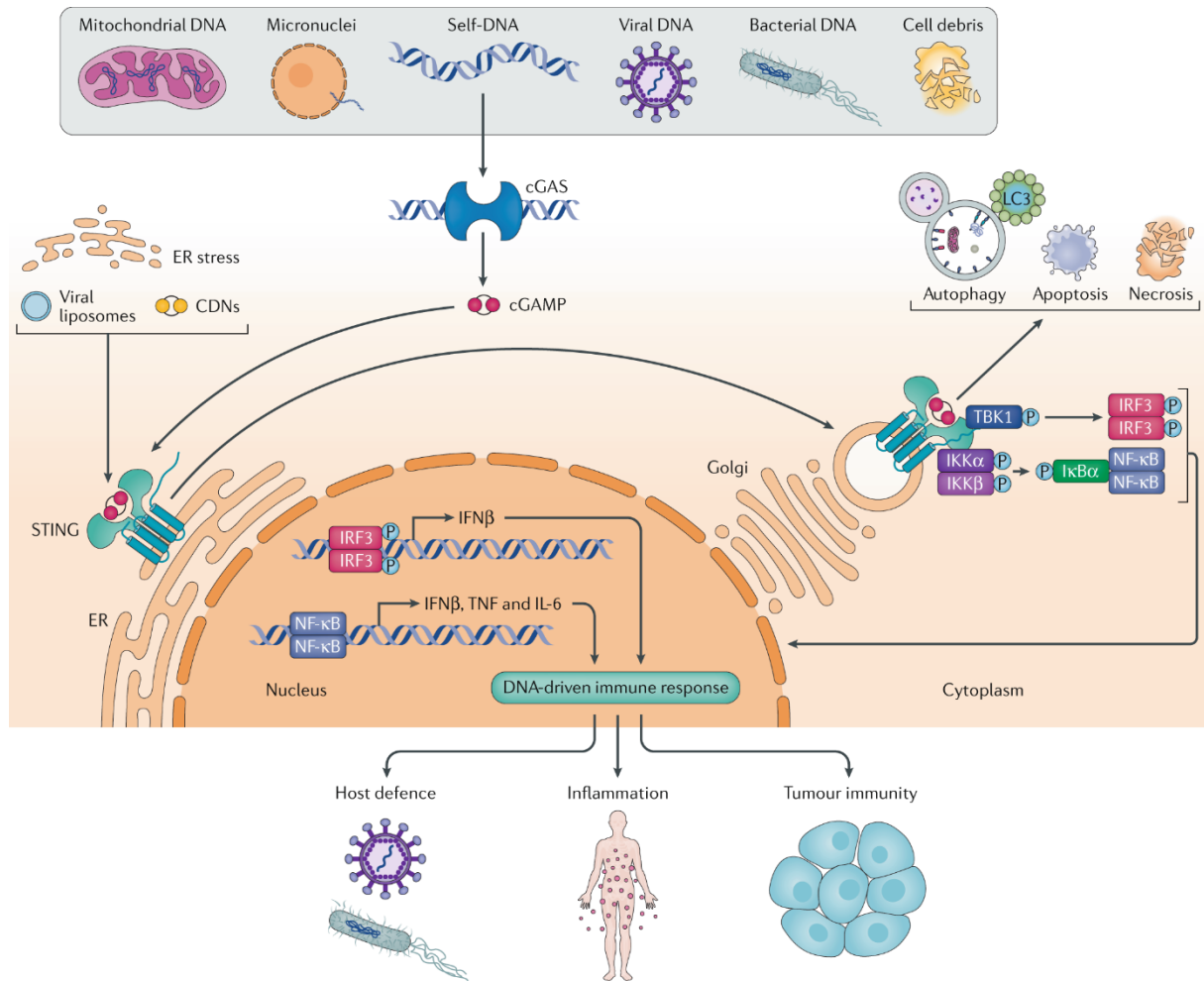


Abbildung 1: Stoffwechselwege der cGAS-cGAMP-STING-IRF3-Signalkaskade. Adaptiert mit freundlicher Genehmigung von Motwani et al.^[8] Copyright 2019 Springer Nature.

2'3'-cGAMP wirkt als Immunotransmitter, dessen Signal durch sogenannte *gap junctions* an benachbarte Zellen weitergegeben werden kann und dadurch verstärkt wird.^[19] Auch ein Transport über Virionen ist denkbar.^[20] Das intrazelluläre cGAMP-Vorkommen ist schwierig zu bestimmen und hängt stark vom jeweiligen Zelltypus ab. Die Forschungsgruppe von Lingyin Li^[21] an der Universität in Stanford unternahm mithilfe von Maus-Krebszelllinien (4T1-Luc) erste Versuche diese äußerst geringen Konzentrationen zu messen. Der Luciferase Reporter Assay ergab eine cGAMP-Konzentration von 5.8×10^{-10} nmol/Zelle (~ 150 nM). Li stellte zudem die Hypothese auf, dass Krebszellen als ein primäres Ziel verfolgen, das Zellinnere von cGAMP zu leeren und somit eine Entzündungsreaktion zu verhindern. Eine andere Möglichkeit ist die Konzentrationsbestimmung über cGAMP-Antikörper nach Miyakawa et al.^[22] (erhaltene Werte liegen zwischen 0.1 – 100 nM).

Auch in gesundem Zustand erfolgt der Abbau von 2'3'-cGAMP nicht innerhalb der Zelle, sondern durch die extrazelluläre Phosphodiesterase ENPP1 (*ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1*).^[23] Der dafür notwendige Export von 2'3'-cGAMP in die extrazelluläre Matrix ist noch nicht vollständig geklärt. Es gibt lediglich Hinweise, dass spezifische Folat Transporter wie SLC19A1 eine wichtige Rolle beim *Import* spielen und CDNs selektiv erkennen.^[24] Dahingegen wurde bei Pockenviren eine speziell kodierte Phosphodiesterase gefunden, die in Säugerzellen eine intrazelluläre cGAMP-

Hydrolyse bewirkt. Die enthaltenen Poxine (*poxvirus immune nucleases*) ermöglichen diesen Viren eine Hemmung der cGAS-STING-Immunantwort durch Reduktion der cGAMP-Konzentration.^[25,26] Während die Hydrolyse von 2'3'-cGAMP durch ENPP1 nach Kato et al.^[27] als erstes an der 2'-5'-Phosphodiesterbindung stattfindet, erfolgt die Spaltung durch Poxine beginnend mit der 3'-5'-Bindung (Abbildung 2).

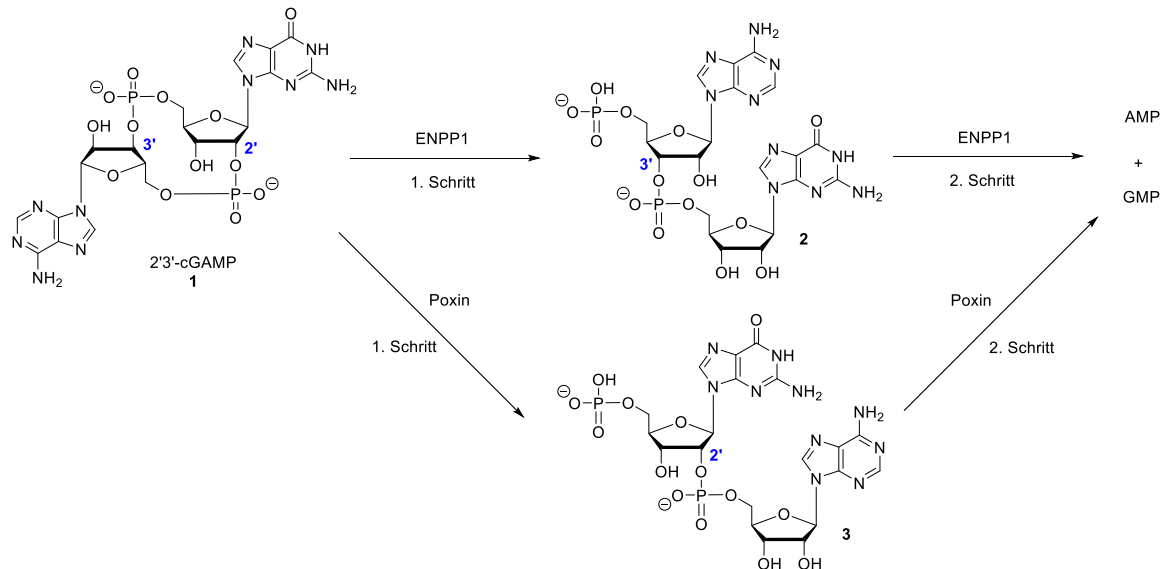


Abbildung 2: Abbau von asymmetrischem 2'3'-cGAMP (1) durch ENPP1 und das virenbasierte Poxin. Der Unterschied liegt in der Reihenfolge der Hydrolyse der ersten Phosphodiesterbindung.

Informationen über die Bindungsverhältnisse von cGAMP an STING können aus kristallographischen Daten gewonnen werden (Abbildung 3). Entscheidend sind einerseits π -stacking-Interaktionen zwischen den cGAMP-Purinbasen und den STING-Tyrosinresten (Y167) und Wasserstoffbrückenbindungen an der Kopfzone (S241, V239). Andererseits fallen starke ionische Phosphat-Wechselwirkungen mit Arginin (R238) von oben und mit Threonin (T267) und Serin (S162) von unten auf.^[28] Die Orientierung von 2'3'-cGAMP oder seines Strukturisomers 3'3'-cGAMP (Kapitel 1.2) wird in Kristallstrukturen zu gleichen Anteilen um 180° gedreht vorgefunden. Dieser Befund ist besonders auffällig für das asymmetrische 2'3'-cGAMP. Auch deshalb, weil viele spätere STING-Agonisten als symmetrische Dimere binden.

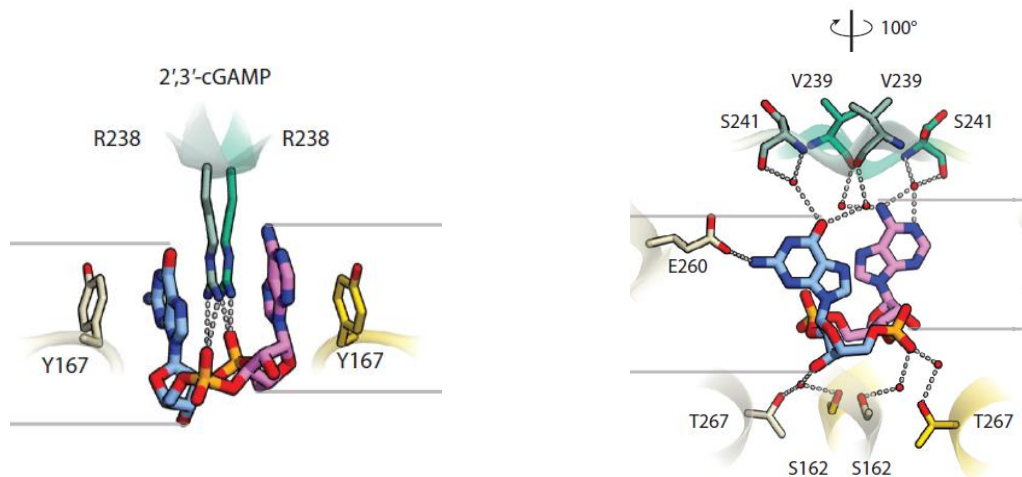


Abbildung 3: Bindungsinteraktionen von 2'3'-cGAMP mit STING. Adaptiert mit freundlicher Genehmigung von Kato et al.^[28] Copyright 2017 Annual Reviews.

1.2. 2'3'-cGAMP als entscheidender Modulator der zelleigenen Immunantwort

Sekundäre Botenstoffe (*second messenger*) sind unverzichtbar in der zelleigenen Signaltransduktion zur Weiterleitung äußerer Reize. Unter den wichtigsten Vertretern befinden sich beispielsweise zyklisches Adenosinmonophosphat (**4**, cAMP), Calcium-Ionen (**5**) und Inositoltriphosphat (**6**, IP₃). Die kleinen Moleküle übertragen Signale und sind meistens aus allgemein verfügbaren Grundbausteinen zusammengesetzt (Abbildung 4). cAMP wird eine fundamentale Vermittlerrolle in der Zellantwort von Hormonen und Neurotransmittern zugeschrieben. Es wird in Verbindung mit der Regulation von Ionenkanälen für Na⁺ und K⁺ gebracht.^[29] Calcium-Konzentrationen fluktuieren dynamisch innerhalb der Zelle und regen Prozesse wie die Muskelkontraktion oder Zellteilung an.^[30] In engem Zusammenspiel wird daran IP₃ gekoppelt, das die Calcium-Oszillationen mitsteuert.^[31] Auch während der Befruchtung ist IP₃ ein wichtiger Signalüberträger.

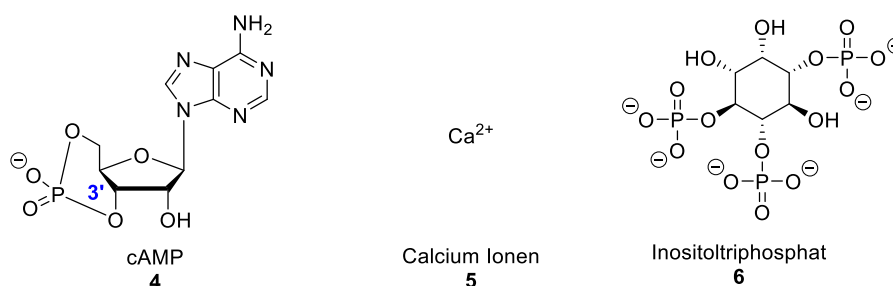


Abbildung 4: Drei wichtige *second messenger* der Zelle.

Etwas komplexer aufgebaut sind die zyklischen Dinukleotide (CDNs). Sie stellen nützliche *second messenger* in vielen Organismen dar, wie z.B. zyklisches Diguanylat (**7**, 3'3'-c-di-GMP) und zyklisches Diadenylylat (**8**, 3'3'-c-di-AMP). Diese „Zwillings-Cyclophane“ sind über zwei kanonische 3'-5'-Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft (Abbildung 5), wie sie auch in den linearen Polymeren der DNA und RNA zu finden sind.^[32] In Bakterien sind sie an essentiellen Aufgaben wie der Regulation der Genexpression^[33], Zellwandsynthese^[34], Virulenz^[35], *quorum sensing*^[36] und Zellhomöostase^[37] beteiligt. Der RNA-Forscher Ronald Breaker nimmt an, dass die zyklische Struktur dazu dienen könnte, sie von sonstigen RNA-Abbauprodukten und Standardmetaboliten innerhalb der Zelle unterscheiden zu können.^[38] In ähnlicher Weise ist die zyklische Struktur von cAMP von ihrer Mutterverbindung Adenosintriphosphat (ATP) abgegrenzt. cAMP nimmt bei den wichtigen Signaltransduktionen von G-Proteinen eine zentrale Botschafterrolle ein.^[39,40]

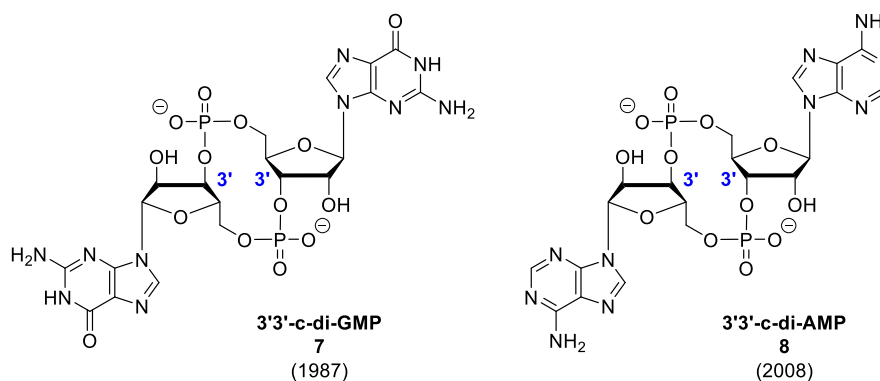


Abbildung 5: Zwillings-CDNs sind an vielen Stoffwechselprozessen beteiligt. c-di-GMP wurde 1987 von der Benziman Gruppe^[41] entdeckt, c-di-AMP erst 21 Jahre später von der Hopfner Gruppe^[42] (2008).

Die CDNs werden vorherrschend aus den zytosolischen Ressourcen ATP oder GTP (Guanosintriphosphat) synthetisiert. Unter enzymatischer Katalyse und Abspaltung von Pyrophosphat werden die stabilen Phosphodiesterbrücken ausgebildet. Das Ansteigen der CDN-Konzentration hat anschließend die Aktivierung nachgeschalteter Proteine zur Folge und initiiert eine Reizweiterleitung. Besonders interessant ist dieser Prozess der Signalübertragung bei der zellangeborenen Immunantwort.^[43] Die Infektionen von Pathogenen wie Bakterien oder Viren werden im gesunden Organismus sofort erkannt und im Zuge einer komplexen Signalkaskade über cGAS und STING bekämpft.^[44] Bei Krankheitsbefall spielt das in Kapitel 1.1 behandelte 2'3'-cGAMP eine entscheidende Rolle, da die Stärke der angeborenen Immunantwort klar auf die Konzentration dieses Botenstoffs zurückzuführen ist (Abbildung 2). Die Schlüsselfunktion ist die Bindung an das Transmembranprotein STING, welches die weitere Signalkaskade in Gang setzt.^[45-47] Interessante Nebeninformation: cGAMP sollte nicht mit dem Protein GCaMP verwechselt werden, einer künstlichen und weit verbreiteten Calcium-Sonde.^[48]

Grundsätzlich sind vier Konstitutionsisomere von cGAMP denkbar (Abbildung 6). In einer ersten Veröffentlichung von Wu et al.^[49] wurde davon ausgegangen, dass es sich bei der physiologisch aktiven Verbindung um eine Substanz mit zwei kanonischen 3'-5'-Verknüpfungen der Phosphodiesterbindung handelte (3'3'-cGAMP), ähnlich wie bei den bekannten Verbindungen c-di-GMP (**7**) und c-di-AMP (**8**). Außerdem wurde 3'3'-cGAMP bereits ein Jahr zuvor (2012) im Cholera-Erreger *Vibrio Cholerae* entdeckt.^[50,51] Hier wird es durch den Virulenzfaktor DncV (Dinukleotid Zyklase in *Vibrio Cholerae*) synthetisiert.^[52] Doch moderne Methoden wie nano-LCMS, RP-HPLC, NMR und Röntgenstrukturanalyse konnten in der Struktur zweifelsfrei eine gemischte 2'-5'-/3'-5'-Verknüpfung nachweisen, die durch cGAS in Säugerzellen produziert wird.^[53]

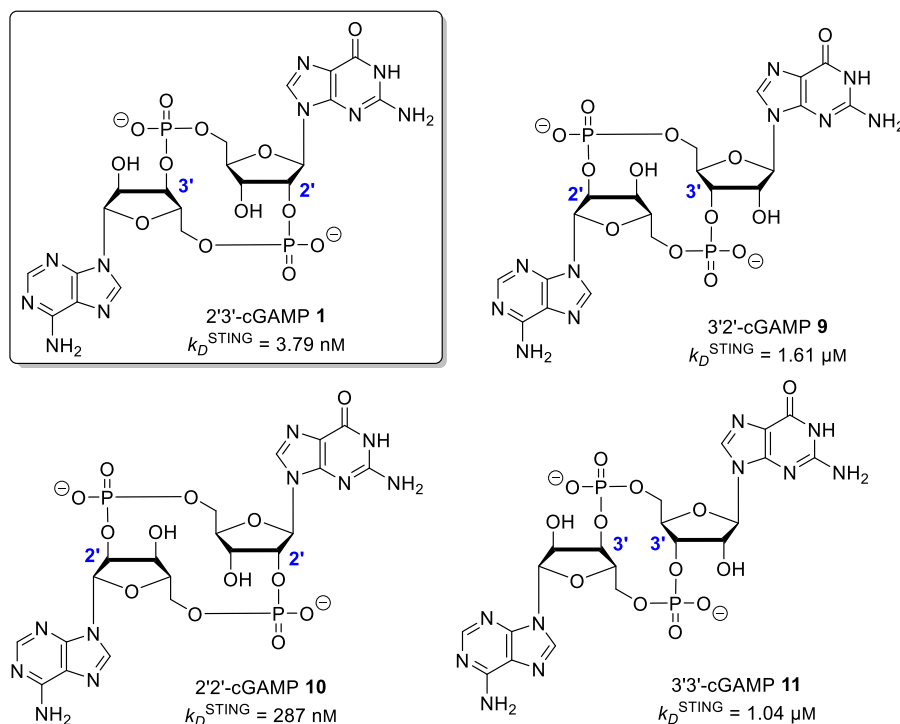


Abbildung 6: Mögliche Strukturisomere von zyklischem Guanosinmonophosphat Adenosinmonophosphat (cGAMP), einem „zweieiigen Zwillings“. Die Bindungsdissoziationskonstante k_D^{STING} wurde von Zhang et al.^[47] jeweils über isothermale Titrationskalorimetrie bestimmt.

Bemerkenswert ist die deutlich höhere Bindungsaffinität (ca. 25-fach) von 2'3'-cGAMP ($k_D^{\text{STING}} = 3.79 \text{ nM}$) an STING im Gegensatz zu seinem 3'3'-Isomer ($k_D^{\text{STING}} = 1.04 \text{ }\mu\text{M}$), das bisher nur in Bakterien gefunden wurde.^[46,47,54] Demnach scheinen auf den ersten Blick minimale Konformationsänderungen einen starken Einfluss auf die Protein-Ligand-Bindung zu haben. Che et al.^[55] begründen dies durch die große Bedeutung der strukturellen Präorganisation von cGAMP. Die beiden Phosphodiesterbrücken innerhalb des Makrozyklus lassen viele verschiedene Konformationszustände zu. Durch eine 2'-5'-Verknüpfung wird das Molekül starrer, was sich positiv auf die entropischen Beiträge zur Freien Gibbs-Bindungsenergie an STING auswirkt. Außerdem hat 2'3'-cGAMP eine höhere Neigung mit Arg232 von STING Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Das ist ein entscheidender Faktor.

Das Auftreten der ungewöhnlichen 2'-5'-Verknüpfung der Phosphodiesterbindung ist bei näherer Betrachtung nicht neu. Das Enzym OAS1 (2'-5'-Oligoadenylatsynthetase 1) erkennt fremde doppelsträngige RNA im Cytoplasma und synthetisiert als Warnsignal 2'-5'-verbrückte Oligoadenylate, die wiederum eine Entzündungsreaktion auslösen.^[56,57] Diese Signalkaskade ist ebenfalls Teil des angeborenen Immunsystems. OAS1 besitzt strukturelle und funktionale Ähnlichkeiten zu cGAS. Daher wird eine parallele Evolution vermutet.^[58]

2019 entdeckte die Forschungsgruppe von Philip Kranzusch^[59] cGAS/DncV-ähnliche Enzyme in Bakterien, die das Repertoire an kanonischen 3'3'-CDNs mit einem neu gefundenen zyklischen UMP-AMP (3'3'-cUAMP) erweiterten. Erstmals wurde mit Uridin auch eine Pyrimidinbase in natürlichen CDNs gefunden. Auf synthetischem Wege konnten Pyrimidin-Analoga bereits hergestellt werden.^[60] Des Weiteren wurde sogar ein zyklisches Trinukleotid (cAMP-AMP-GMP) gefunden. Beide Verbindungen hatten jedoch keinen Einfluss auf STING, anders als cGAMP, c-di-AMP oder c-di-GMP. 3'3'-cUAMP bindet dagegen an den proinflammatorischen Sensor RECON (*reductase controlling NF- κ B*) in Säugerzellen in den Maßen wie z.B. c-di-GMP an STING.^[61]

1.3. Krankheiten bei Störung des cGAS-STING-Gleichgewichts

Eine ausgeglichene Regulation des cGAS-STING-Pfads ist essentiell für das Überleben eines Organismus. Ist das Gleichgewicht dieser Signaltransduktion gestört, kann dies schwerwiegende Krankheiten nach sich ziehen. Denn sowohl die Herunterregulierung als auch die Hochregulierung der cGAS-STING-Immunantwort ist problematisch. Im ersten Fall wird das Immunsystem geschwächt und die Immunantwort fällt z.B. bei Krebs viel zu schwach aus. Entartete Tumorzellen werden nicht als solche identifiziert, sodass sie sich ungehindert vermehren können. Ein ohnehin ungelöstes Problem in der Biologie. Die Krebsimmuntherapie soll helfen, die Tarnung der Tumorzellen vor dem Immunsystem (*immune escape*) durch sogenannte Immuncheckpoint Blockaden aufzuheben. Gelingt dies, können stimulierte Immunzellen wie T-Zellen die Tumorzellen nachfolgend abtöten (siehe STING-Agonisten in Kapitel 1.4).^[62-64]

Eine Überaktivierung von STING löst dagegen Entzündungen in körpereigenen gesunden Zellen aus. Es kommt zu einer Autoimmunreaktion (z.B. durch Interferonopathien^[65]). Bei Fehlfunktionen der angeborenen Immunantwort lohnt sich daher der Blick auf Punktmutationen der zentral beteiligten Proteine.^[11]

Das Gen *TMEM173* kodiert das STING-Protein. Neben dem humanen STING-Wildtyp sind weitere Haplotypen geläufig, die unterschiedliche Einzelnukleotid-Polymorphismen aufweisen. Auf Grundlage des *1000 Genome Project*^[66], bei dem die Genome von 2500 Menschen sequenziert wurden, treten demnach in der Bevölkerung folgende hSTING-Isoformen auf: bei 20.4 % R71H-G230A-R293Q (HAQ), bei 13.7 % R232H, bei 5.2 % G230A-R293Q (AQ) und bei 1.5 % R293Q (Q). Diese Varianten werden weiterhin in ähnlichem Maße von 2'3'-cGAMP aktiviert, haben jedoch teils unterschiedliche Affinitäten zu den bakteriellen CDNs (c-di-GMP, c-di-AMP und 3'3'-cGAMP). In Bezug auf die Erforschung möglicher STING-Agonisten oder -Antagonisten müssen folglich immer die jeweiligen STING-Haplotypen berücksichtigt werden, da sich die therapeutische Akzeptanz verändern kann. Abgesehen davon unterscheidet sich die Proteinsequenz in Abhängigkeit der Spezies. Der Vergleich von mSTING und hSTING zeigt, dass dies fundamentale Auswirkungen haben kann (siehe Kapitel 1.5).^[11,67]

Das Vorkommen von STING-Polymorphismen und zusätzlichen Punktmutationen kann außerdem das Auftreten bestimmter Krankheiten erklären. Beispielsweise handelt es sich bei der Entzündungsstörung VAPS (*vascular and pulmonar syndrome*) um eine *gain-of-function* Mutation von STING. Die drei Mutationen N154S, V155M und V147L bewirken eine STING-Hyperaktivität und eine damit gesteigerte Ausschüttung von Typ-1-Interferonen. Patienten klagen über wundte Backen, Nasen, Finger und Zehen. Die Autoimmunkrankheit SAVI (*STING-associated vasculopathy with onset in infancy*) äußert sich ebenfalls durch eine genmutierte STING-Hyperaktivität – diesmal sogar auch in Abwesenheit von entzündungsstimulierender zytosolischer DNA. Dank der Entdeckung von STING im Jahre 2008 werden diese länger beobachteten Syndrome zunehmend verstanden und Therapiekonzepte entworfen.^[68]

Auch zelleigene doppelsträngige DNA kann die cGAS-STING-Achse aktivieren, sobald sie fälschlicherweise im Zytosol auftaucht. Unter physiologischen Bedingungen sind für die Beseitigung jedoch primär die Nukleasen TREX1 (*three-prime exonuclease 1*) und lysosomale DNase II zuständig.^[69] Fallen diese aufgrund von *loss-of-function* Mutationen aus, wird die Entzündungsreaktion durch cGAS gestartet. Autoimmunerkrankungen wie das Aicardi-Goutières-Syndrom^[70] (spastische Lähmungen) und der systemische Lupus erythematodes^[71] (verschiedene Organschäden) werden damit in Verbindung gebracht.^[72,73]

1.4. cGAMP-Analoga – großes therapeutisches Potenzial

Seit der Entdeckung von STING^[74] (2008) und 2'3'-cGAMP^[45] (2013) herrscht ein großes Interesse in universitärer und pharmazeutischer Forschung an potenziellen Agonisten oder Antagonisten (Abbildung 7). Die Hoffnung auf Heilung durch gezielte und selektive Immunzelltherapien verschiedenster Krankheiten wie z.B. Krebs ist groß.^[75] Ziel ist es, eine alternative Behandlungsmöglichkeit zur Chemotherapie zu schaffen. Diese hat trotz zahlreicher Verbesserungen nach wie vor verheerende Nebenwirkungen. Krebszellen können dadurch zwar abgetötet werden, doch auch körpereigene Zellen befinden sich am Limit des Überlebens.^[76,77]

Die Forschung an chemischen Verbindungen, die die medizinischen und physikochemischen Anforderungen eines Medikaments erfüllen, ist ohnehin ein sensibles Thema nach den Lipinski Regeln („*rule of 5*“). Demnach sollten Moleküle beispielsweise ein bestimmtes Molekulargewicht ($M_w < 500$ g/mol) oder die Anzahl an H-Donoren (< 5) oder -Akzeptoren (< 10) nicht überschreiten.^[78]

Im Falle von 2'3'-cGAMP ($M_w = 674$ g/mol, > 12 H-Akzeptoren, 7 H-Donoren) werden die genannten Voraussetzungen nicht erfüllt. Zudem ist das Molekül zweifach negativ geladen und besitzt schlechte Zellpenetrationseigenschaften.

Für die Entwicklung neuer Arzneimittel, die ohne größere Substanzbibliotheken für *High-Throughput Screenings* oder *in silico docking* Studien entworfen werden, bietet es sich an strukturell sehr nahe am Naturstoff zu bleiben und lediglich geringere Modifikationen vorzunehmen.^[79] Im Falle von 2'3'-cGAMP (**1**) bedeutet dies die Abwandlung der Nukleobasen, Phosphodiesterbrücken oder Zuckersubstitutionen.^[80]

Phosphorothioat-Analoga wie 2'3'-cG^SA^SMP (**12**, $k_D^{STING} = 5$ nM)^[23] und 2'3'-c-di-A^SMP (**13**, CDA, kein genauer k_D^{STING} -Wert bekannt, lediglich die Angabe „increase the binding affinity for hSTING by at least 10-fold“)^[81] zeigen verbesserte Bindungseigenschaften im Vergleich zu normalen CDN auf Phosphodiesterbasis. Die teilweise höhere Bindungsaffinität zu STING und verbesserte Zellpermeabilität durch die Insertion eines Schwefels in die Phosphodiesterbrücken brachte Verbindung **13** sogar in klinische Phase-II-Studien (ADU-S100: Behandlung von PD-L1 positiven Plattenepithelkarzinomen in der Kopf-Hals-Region, HNSCC).^[81-83] Außerdem erhöht sich die Bioverfügbarkeit, da der Abbau durch die Phosphodiesterase ENPP1 deutlich langsamer erfolgt.^[27] Auch Merck Sharpe Dome entwickelt ein synthetisches CDN (MK-1454) in Kombination mit dem Antikörper Pembrolizumab derzeit in Phase-I-Studien für die Therapie von soliden Tumoren und Lymphomen. Die Struktur ist nicht bekannt.^[84,85] Fluorierte Inosin-Derivate (**14**) zeigen in THP-1 Immunzellen höhere EC₅₀-Werte als natürliches 2'3'-cGAMP. Der nächste Schritt hin zu Tierversuchen ist bereits in Vorbereitung (Abbildung 7).^[86]

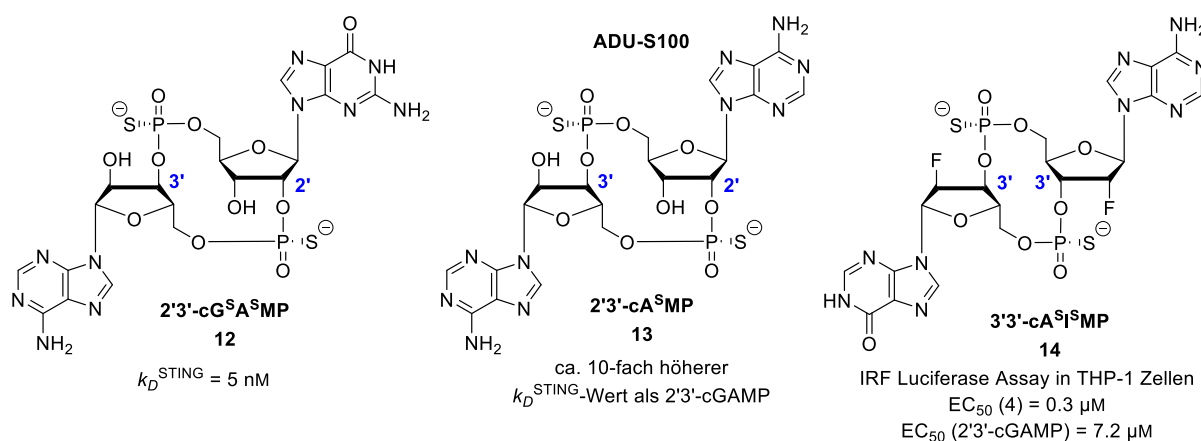


Abbildung 7: Potenzielle *small molecules* für eine STING-basierte Immuntherapie.

Das Unternehmen *Aduro Biotech* hat die Relevanz solcher cGAMP-Derivate als Agonisten der STING-basierten Immuntherapie als eines der ersten erkannt. Es wirbt mit seinen klinischen Kandidaten für die Aktivierung von T-Zellen, die eine Tumorregression herbeiführen können. Dazu werden die STING-Agonisten intravenös in den Tumor injiziert, um eine lokale Entzündungsreaktion hervorzurufen. Tumorzellen exprimieren unverwechselbare Antigene, die von antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems (APCs, z.B. dendritische Zellen) aufgenommen und exponiert werden. ADU-S100 (**13**) stimuliert explizit diese Immunzellen und regt die Rekrutierung und Reifung von T-Zellen an. Die so aktivierten T-Zellen töten im Idealfall den Tumor selektiv ab.

Dennoch soll erwähnt sein, dass die klassischen Anforderungen an *small molecule* Arzneimittel bei diesen CDN-Agonisten ebenfalls nicht zur Gänze erfüllt sind. Die moderate Zellpermeabilität im Tumorgewebe ist nach wie vor eine nicht zu vernachlässigende Herausforderung.^[82,87]

Deshalb lohnt sich die Untersuchung von kleinen neutralen Molekülverbindungen auf Grundlage der Lipinski-Regeln. Denn auch diese können prinzipiell mit STING interagieren und vielversprechende Ergebnisse liefern. Die erste Beispielverbindung für einen neutralen STING-Binder war das chemotherapeutische Agens DMXAA (**15**, 5,6-Dimethylxanthenon-4-essigsäure). Es wurde 2002 in anderem Kontext durch seine antivirale und antitumorale Aktivität in Maus-Modellen bekannt.^[88] Die starke Induktion von Typ-1-Interferonen und anderen Cytokinen erregte großes Aufsehen, doch der genaue Wirkmechanismus blieb zunächst verborgen. Kurz vor der Entdeckung von 2'3'-cGAMP (**1**) im Jahre 2013 wurde erkannt, dass das Molekül an STING bindet (Näheres in Kapitel 1.5).^[89,90] Ein interessantes Detail von DMXAA ist die geringe strukturelle Verwandtschaft zu cGAMP – ähnlich wie bei seiner Weiterentwicklung CMA (**16**, 10-Carboxymethyl-9-acridanon).^[91,92] Über die Jahre hinweg wurden viele weitere Moleküle beschrieben, die aufgrund von unterschiedlichen Screening-Methoden als STING-Binder identifiziert wurden (**17-20**, Abbildung 8). Nicht bei allen Substanzen sind STING-Bindungsdaten publiziert.^[83,93,94]

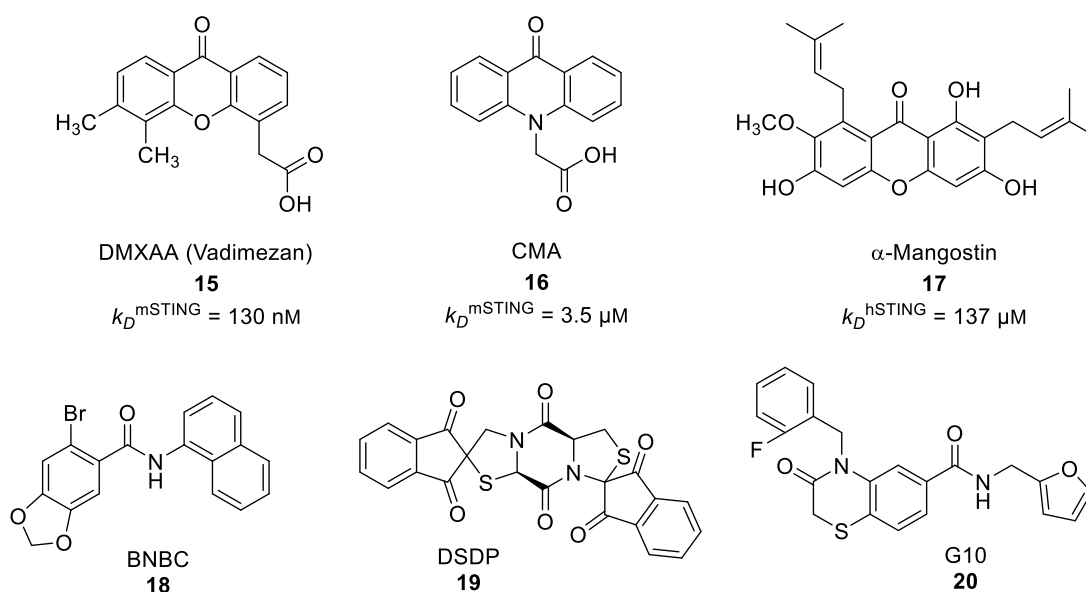


Abbildung 8: Neutrale *small molecules*, die mögliche STING-Agonisten darstellen.^[80,94]

2018 entwickelten Ramanjulu et al.^[95] vom Unternehmen GlaxoSmithKline (GSK) eine Serie von verbrückten Amidobenzimidazol-Dimeren (diABZI, **21** und **22**). Verbindung **21** ($k_D^{\text{STING}} = 1.6 \text{ nM}$) konnte mehr als doppelt so gut an STING binden wie natürliches 2'3'-cGAMP ($k_D^{\text{STING}} = 3.79 \text{ nM}$). Zur Entdeckung und Optimierung der Struktur halfen eine große Substanzbibliothek und ein Ligandenverdrängungs-Experiment mit STING. Bei Untersuchungen mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PMBCs, gutes Modell des Immunsystems) überzeugten Substanz **21** ($3.1 \text{ } \mu\text{M}$) und **22** (130 nM) aus Abbildung 9 mit deutlich potenteren EC_{50} -Werten im Vergleich zu 2'3'-cGAMP ($53.9 \text{ } \mu\text{M}$). Der EC_{50} -Wert ist ein Maß für die mittlere effektive Konzentration bei halbmaximalem Effekt. Die Autoren nennen als möglichen Grund die bessere Zellpermeabilität ihrer Verbindungen.

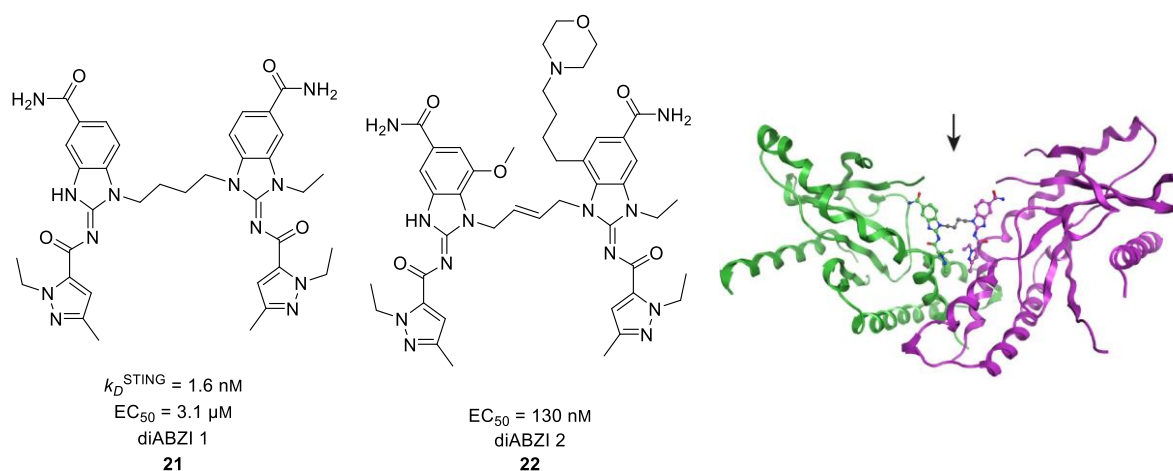


Abbildung 9: Zwei der aktuell vielversprechendsten STING-Agonisten in der medizinischen Prüfung: **21** und **22**. In mononukleären Zellen des peripheren Blutes zeigen die Verbindungen verbesserte EC_{50} -Werte. Adaptiert mit freundlicher Genehmigung von Ramanjulu et al.^[95] Copyright 2018 Springer Nature.

Auch Moleküle mit zwei chiralen Zentren finden Anwendung in Form racemischer Gemische. Verbindung **23** ist ein schwacher STING-Antagonist und wurde aus verschiedenen Testbibliotheken identifiziert. Das Racemat bindet an die offene *inaktive* Form von STING. Die Co-Kristallstruktur offenbart die Neigung von *small molecules* sich als Dimere an STING anzulagern (Abbildung 10).^[96]

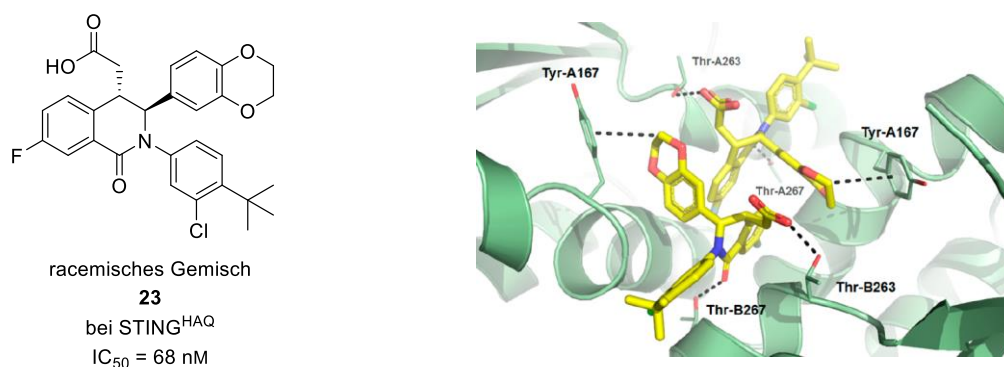


Abbildung 10: Eines der möglichen Konfigurationsisomere von **23** bindet beispielhaft an STING als Homodimer (rechts). Adaptiert mit freundlicher Genehmigung von Siu et al.^[96] Copyright 2019 American Chemical Society (ACS).

Abgesehen von der Blockade der Bindungstasche kann STING auch durch andere Mechanismen inhibiert werden. Die Forschungsgruppe von Andrea Ablasser^[97] berichtete über die kovalente Bindung von *small molecules* (Elektrophil **24**) an der Cys91 Position von STING (Abbildung 11). Dadurch wird die Palmitoylierung^[98] des STING-Proteins an jener Position gestört, die einen unerlässlichen Zwischenschritt für die weitere Signalkaskade darstellt. Ohne diese posttranslationale Modifikation wird die Oligomerisierung von STING im Golgi-Apparat verhindert und es kommt zu keiner Cytokinproduktion. Die Autoren zeigten, dass es sich um eine elegante Methode handelt, um die STING-Aktivität in menschlichen und murinen Zellen signifikant zu dämpfen (z.B. bei *gain-of-function* STING-Mutationen).

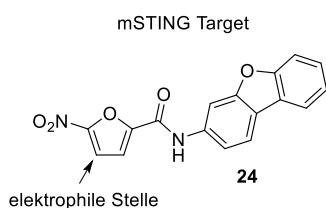


Abbildung 11: Kovalente Inhibierung mithilfe des STING-Antagonisten **24**. Durch diesen Kandidaten wird die Palmitoylierung von STING und damit ein wichtiger Schritt der Signaltransduktion verhindert.

Der Mechanismus der Inhibierung kann durch einen nukleophilen Angriff von Cys91 an das Nitro-Michael-System von Verbindung **24** beschrieben werden (Abbildung 12). Unter Abspaltung von Wasser ist dieser Schritt zu Produkt **25** irreversibel. Neben den Nitrofuran-Verbindungen sind auch Nitrooleate von Bedeutung.^[99]

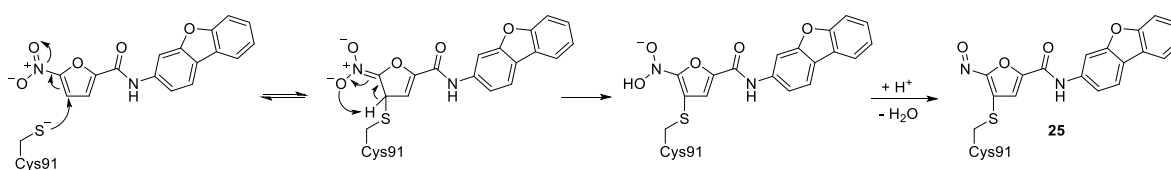


Abbildung 12: Irreversible kovalente Bindung an Cys91.

Neben STING bietet auch cGAS ein attraktives Ziel für die Entwicklung von Arzneimitteln. In Bezug auf eine zu hohe Immunantwort bei speziellen Autoimmunerkrankungen (siehe Kapitel 1.3) ist eine reduzierte cGAS-Aktivität von therapeutischer Bedeutung. Vincent et al.^[100] berichten von einer ausführlichen Strukturoptimierung nach einem *High-Throughput Screening* von über 100.000 Substanzen. Das Verfahren führte sie zu Molekül **26** ($IC_{50} = 1.89 \mu M$). In Makrophagen von autoimmunen Mausmodellen (Aicardi-Goutières-Syndrom) konnte ein Rückgang der Interferonexpression erwirkt werden. Anders als bei STING spielt für die Bindung an die aktive cGAS-Tasche der Kontakt mit DNA eine Rolle (Abbildung 13).

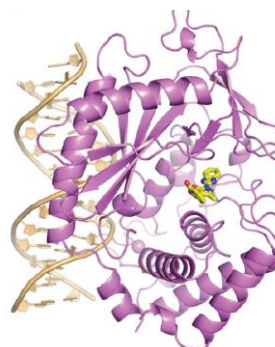
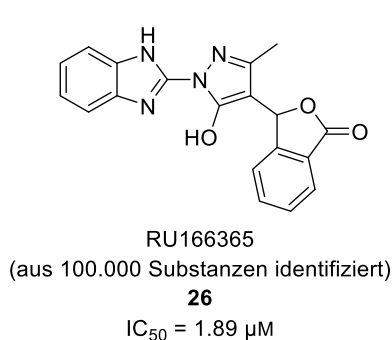


Abbildung 13: Ein cGAS-Antagonist (**26**) mit neutralem Charakter. Rechts in Co-Kristallstruktur mit cGAS. Adaptiert mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature, Nat. commun., Vincent et al.^[100] (Creative Commons Attribution 4.0 International License 2017)

1.5. Strukturelle Einblicke in die Bindung des Moleküls DMXAA an STING

Schon zu Beginn der Entdeckung der neuen cGAS-STING-Achse wurde DMXAA (**15**, auch bekannt als Vadimezan in kardiovaskulären Therapien^[101]) als STING-Binder identifiziert.^[90] Zunächst entfachte eine Kombinationstherapie von DMXAA, Paclitaxel und Carboplatin Begeisterung in Phase-II-Studien

bei Lungenkrebs (nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom).^[102,103] Diese hielt allerdings nicht lange an, da die bisherigen vielversprechenden Ergebnissen nicht reproduzierbar waren. Die Phase III musste abgebrochen werden.^[104] Erst deutlich später kristallisierte sich der Grund dafür heraus. DMXAA (**15**) bindet nur an mSTING – und nicht an hSTING.^[67,105] In Bezug auf die Übertragbarkeit der immunologischen Ergebnisse von Maus-Experimenten auf den Menschen war dies ein Rückschlag.

Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede von STING in den jeweiligen Organismen sind von entscheidender Bedeutung. Gao et al.^[106] verweisen auf eine hohe Übereinstimmung der jeweiligen Aminosäuresequenz in mSTING und hSTING (68 % Identität und 81 % Ähnlichkeit). Dennoch weichen die Bindungsaffinitäten gegenüber DMXAA stark voneinander ab.^[107] Um diesem Befund auf den Grund zu gehen führten Gao et al.^[106] spezielle STING-Substitutionsexperimente durch. Sie fanden heraus, dass die Bindung von DMXAA (**15**) an hSTING durch die unterschiedlichen STING-Punktmutationen S162A, Q266I und G230I erheblich gesteigert werden konnte. Diese Punktmutationen befanden sich innerhalb der Deckelregion der Bindungstasche. Im Gegensatz zum hSTING-Wildtyp konnte bei diesen hSTING-Varianten eine Interferon-Expression durch DMXAA gemessen werden. Die hydrophoben Interaktionen des hSTING-DMXAA-Komplexes nahmen beispielsweise durch die Punktmutation G230I zu und stärkten die Bindung (Abbildung 14). Die Selektivität der DMXAA-STING-Bindung zeigt, dass minimale Änderungen innerhalb der STING-Bindungstasche große Auswirkungen auf die Stärke des Protein-Ligand-Komplexes haben.

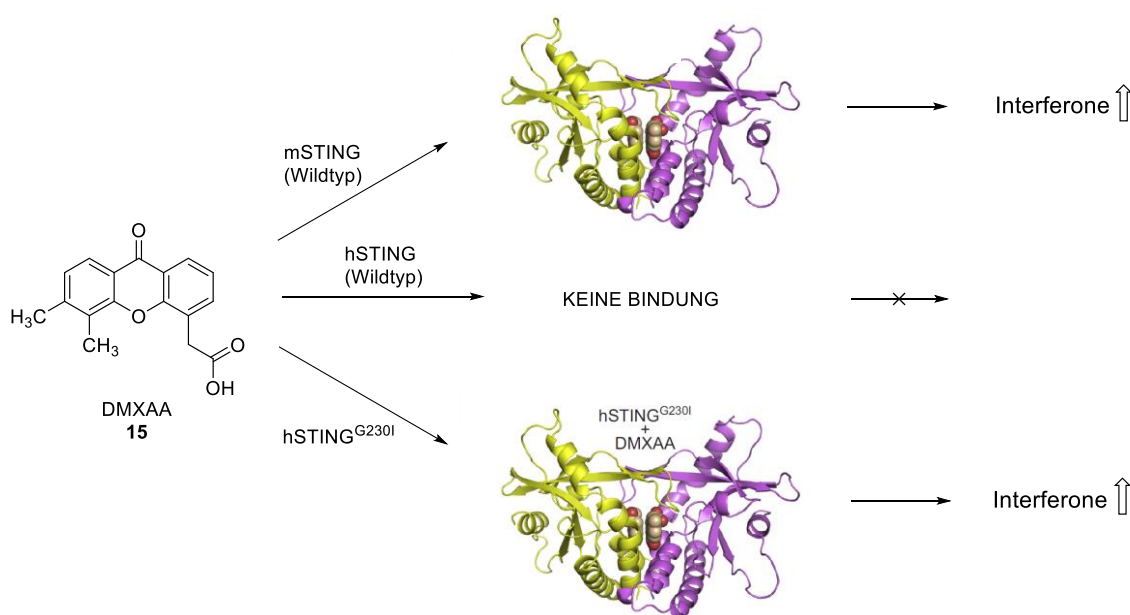


Abbildung 14: Die chemische Mikroumgebung in der STING-Bindungstasche ist entscheidend. Einzelne Punktmutationen in der Deckelregion des Proteins haben einen großen Effekt auf die Protein-Ligand-Bindung. Adaptiert mit freundlicher Genehmigung von Gao et al.^[106] Copyright 2014 Elsevier, Cell Reports.

Eine alternative Herangehensweise wäre eine Optimierung von DMXAA selbst, um eine Bindung an hSTING zu ermöglichen. Dies stellt eine bessere Therapievariante dar, weil die Einführung einer Punktmutation in die Zellen eines Patienten derzeit unmöglich ist. Hwang et al.^[108] mutmaßten 2019, dass aufgrund der Bindungskontakte in vorhandenen Kristallstrukturen eine C7-Funktionalisierung von DMXAA eine potentielle Bindung an hSTING bewirken würde. Ihre synthetisierten Derivate rund um 7-Bromo-DMXAA und 7-Hydroxy-DMXAA zeigten jedoch ausschließlich Aktivität an mSTING.

Darauf aufbauend stellten Hou et al.^[109] eine Reihe von weiteren potentiellen hSTING-Bindern her, die durch Struktur-Aktivitäts-Beziehungen auf der Grundlage von DMXAA und seiner verwandten Verbindung CMA (**16**) gewonnen wurden (Abbildung 15). Tatsächlich identifizierten sie das Molekül **27**, das zwar deutlich schlechtere *in vitro* Bindungsaffinitäten ($k_D^{\text{STING}} = 26.4 \mu\text{M}$ zu 21.9 nM) zeigte, jedoch vergleichbare EC_{50} -Werte wie 2'3'-cGAMP ($7.45 \mu\text{M}$ zu $7.23 \mu\text{M}$) lieferte.

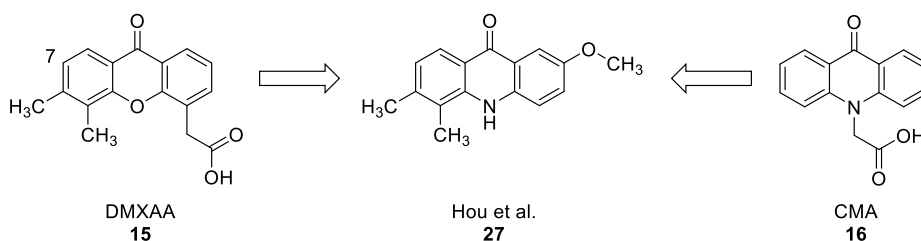


Abbildung 15: Strukturoptimierung von DMXAA (**15**) und CMA (**16**) hin zu Molekül **27**.

1.6. Substitutionsmotive von Phosphodiesterbindungen

In dieser Forschungsarbeit werden neuartig verknüpfte cGAMP-Analoga synthetisiert, um die zellulären Prozesse der Immunantwort genauer studieren zu können. Wie in Kapitel 1.4 diskutiert stellen die zwei negativ geladenen Phosphodiesterbrücken im cGAMP-Zyklus keine optimalen Strukturmerkmale für die Anwendung als Arzneimittel dar. Dies basiert unter anderem auf der verlangsamten Zellpermeation und den schlechten Hydrolyseeigenschaften. Die chemische Substitution dieser beiden Phosphodiesterbrücken (**28**) durch neutral geladene Motive soll daher stärker untersucht werden, um die Arzneimiteigenschaften optimieren zu können. Dafür lohnt sich ein Blick auf gängige Verfahren in der Chemie von Oligonukleotiden.

In der Oligonukleotidsynthese^[110] wird die Einführung von neutralen Phosphodiestertermotiven beispielsweise bei der Entwicklung von therapeutisch aktiven Nukleinsäuren angewandt (Abbildung 16). Dort werden 1,2,3-Triazol-Verbrückungen (**29**) als sogenannte Click-Ligationen zweier DNA- oder RNA-Stränge verwendet, um die Stabilität an dieser Stelle gegenüber dem Verdau von Nukleasen zu erhöhen.^[111] Die Länge einer Phosphodiesterbrücke und Triazol-Verbrückung ist in etwa gleich. Seit Längerem ist bekannt, dass auch Polymerasen die künstliche Triazol-Modifikation tolerieren.

Diese Form der Biokonjugation zweier Oligonukleotidstränge erfolgt durch die prominente Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Click-Reaktion (CuAAC). Die Reaktionsbedingungen sind sehr milde und erlauben die Anwesenheit einer Vielzahl von funktionellen Gruppen, was insbesondere bei Nukleinsäuren der Fall ist.^[112] Die Reaktion selbst basiert auf Huisgen's Forschung^[113] an [2+3]-dipolaren Cycloadditionen und Sharpless' Kupfer(I) katalysiertem Click Mechanismus^[114]. Die nötigen Vorläuferverbindungen dieser Verbrückungstechnik lassen sich durch Azid- und Alkinreste gut in die Nukleosidchemie integrieren. Neben den Triazol-Verbrückungen (**29**) zeigen auch Amid- (**30**), Sulfon- (**31**) und Carbonatstrukturen (**32**) verwandte Eigenschaften zu Phosphodiestergruppen (**28**). Sie stellen ebenfalls ungeladene Alternativen dar.^[115] Welches Substitutionsmotiv jeweils eingesetzt wird, hängt von der gewünschten Stabilität der Zielverbindung, der Schutzgruppenchemie und dem allgemeinen Syntheseaufwand ab.

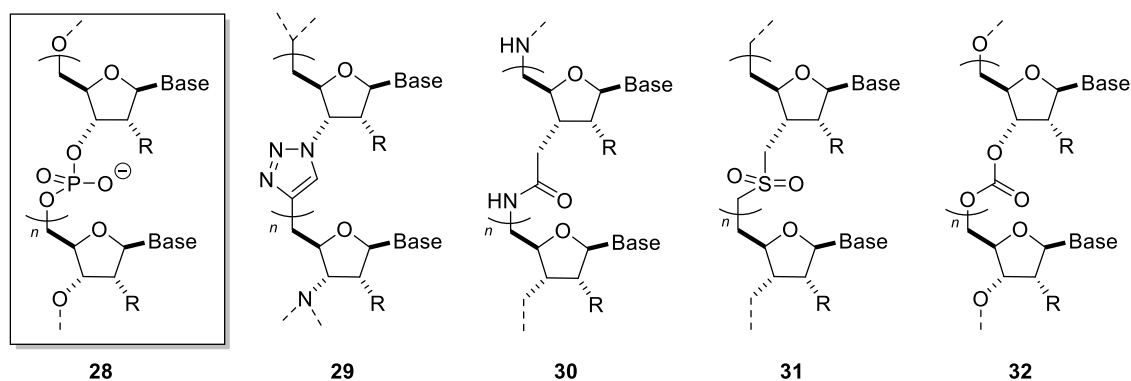


Abbildung 16: Ein Ausschnitt von möglichen Substitutionsmustern von Phosphodiesterbindungen. DNA: R = H. RNA: R = OH.^[115]

Die übliche Synthese von künstlichen Oligonukleotidsträngen wie Verbindung **28** wird im Labor durch die sogenannte Phosphoramidit-Festphasensynthese nach Caruthers^[116] durchgeführt. Bei diesem Vorgehen wird jeder Nukleotidbaustein modular und als chemisches Phosphoramidit in die Nukleotid-Sequenz eingebaut. Zusätzlich gibt es Protokolle von Fujino et al.^[117] mit denen Triazol-Verbrückungen (**35**) an beliebige Stellen von künstlicher RNA eingeführt werden können – abseits der klassischen Phosphoramidit-Chemie. Dazu werden speziell präparierte Nukleotid-Verbindungseinheiten verwendet, die zum einen ein 3'-Azid (**33**) und zum anderen ein 5'-Alkin (**34**) enthalten (Abbildung 17). Über die CuAAC-Reaktion werden die beiden Bausteine chemisch zusammengeführt und bilden dadurch ein neutrales Phosphodiestersurrogat. Die finalen Entschützungschritte und die Abtrennung vom Festphasenharz sind mit der Triazol-Chemie kompatibel.

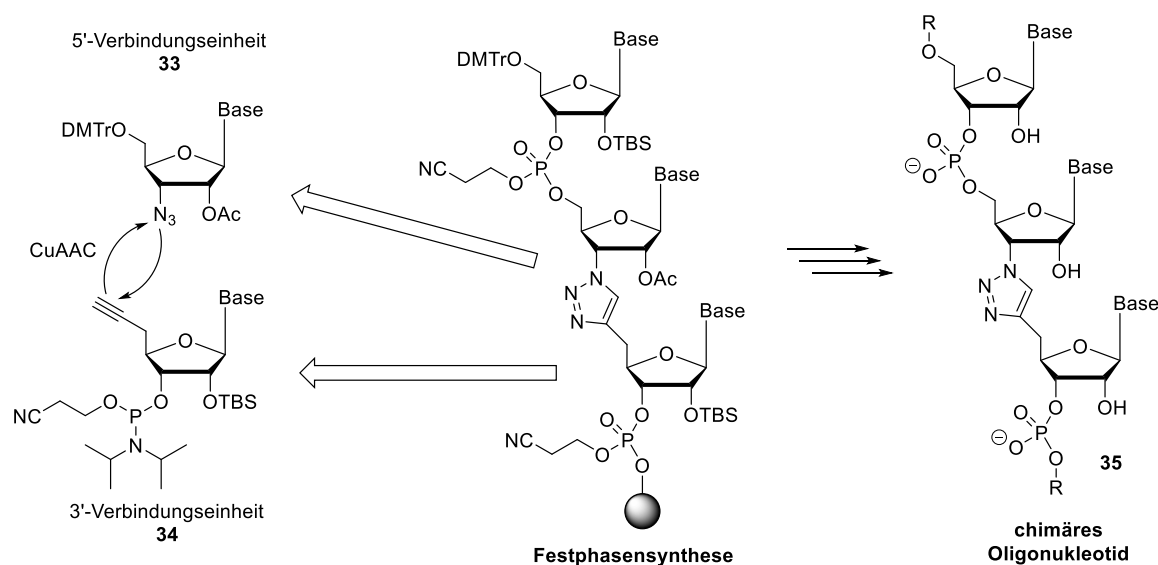


Abbildung 17: Synthese und Struktur des chimären Oligonukleotids **35**. Die Triazol-Verbrückung entsteht durch die CuAAC-Chemie, indem die speziellen Verbindungseinheiten **33** und **34** in die Festphasensynthese integriert werden. Adaptiert von Fujino et al.^[117]

Die biophysikalischen Eigenschaften eines chimären Oligonukleotidstrangs (**35**) können sich durch die Inkorporation einer Triazol-Verbrückung ändern – im Gegensatz zum Strang aus reinen Phosphodiesterbrücken. Darunter fallen beispielsweise die Helixform im Duplex mit einem Komplementärstrang oder die thermodynamische Stabilität. Es muss deshalb im Einzelfall geprüft

werden, ob die Anwendung einer künstlichen Triazol-Verbrückung sinnvoll ist und die darauffolgenden Nukleinsäuremerkmale nicht zu sehr abgewandelt werden (z.B. die biologische Aktivität).^[118,119]

Für die vorliegende Dissertation und die Synthese von neutral geladenen cGAMP-Analoga ist vor allem der Einsatz von Triazol- und Amid-Verbrückungen in zyklischen Verbindungen von Bedeutung. Denn cGAMP stellt einen zweifach verbrückten Phosphodiesterzyklus dar. Die einschlägige Literatur liefert eine überschaubare Anzahl an Beispielen, die für diesen Themenbereich relevant sind.

Als erstes Beispiel soll die Triazol-Modifikation von cADPR (**36**, zyklische ADP-Ribose) diskutiert werden (Abbildung 18). Dieser *second messenger* **36** spielt eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} und ist damit ein essentieller Mediator der Muskelkontraktion und Zellteilung.^[120,121] Das negativ geladene Pyrophosphatgrundgerüst von cADPR erschwert jedoch die Verwendung als Arzneimittel und stellt die medizinische Forschung vor ähnliche Herausforderungen wie bei 2'3'-cGAMP. Daher synthetisierten Swarbrick et al.^[122] das ungeladene Derivat **38**, das anstatt der Pyrophosphatverbindung eine Triazol-Verbrückung enthält. Ausgehend vom Isopropylidengeschützten Molekül **37** mit einem Azid- und Alkinrest konnte der Makrozyklus mittels CuAAC-Chemie geschlossen werden. In biologischen Tests wurde herausgefunden, dass sich die chemische Stabilität und biologische Verfügbarkeit von Triazol-Analogon **38** verbesserte. Die biologische Aktivität war vergleichbar zur Mutterverbindung **36**.

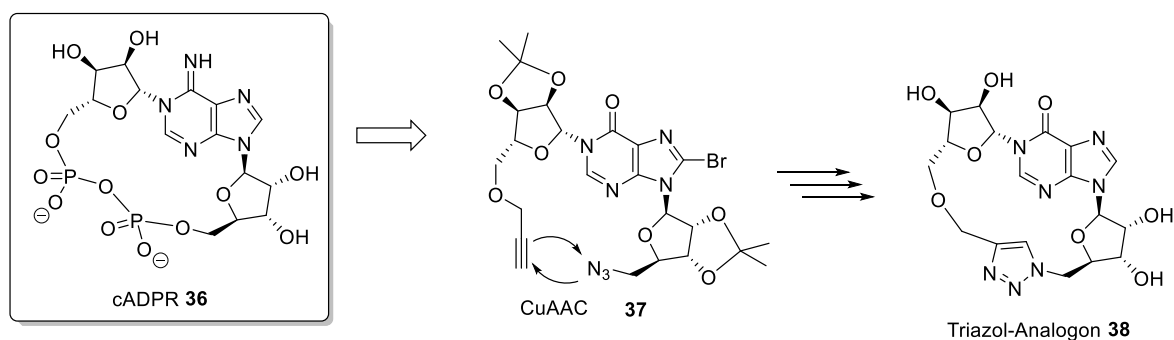


Abbildung 18: Synthese des Triazol-Analogons **38** von cADPR (**36**), einem Regulator für intrazelluläres Ca^{2+} . Die Substitution der Pyrophosphatbrücke durch eine Triazol-Verbrückung hält die biologische Aktivität aufrecht.

Des Weiteren berichteten Fujino et al.^[123] von der doppelt Triazol-verbrückten Verbindung **40**. Dieses symmetrische Molekül ist das erste Beispiel für ein neutral verknüpftes CDN und soll das kanonische 3'3'-c-di-AMP (**8**) imitieren (siehe Kapitel 1.2). Die Synthese von **40** erfolgt aus dem Monomer **39** über CuAAC-Chemie und bedarf keiner speziellen Schutzgruppenvorkehrungen für den Alkin- oder Azidrest. Das ist insofern erstaunlich, da durch dieses Vorgehen durchaus mehrgliedrige Zyklen oder sogar Stränge erhalten werden können. Dazu sind jedoch keine weiteren Informationen angegeben. Die Verbindung ist trotz nicht zu vernachlässigender Ringspannung des 12-gliedrigen Makrozyklus stabil und isolierbar. Zu biologischen Eigenschaften wurde nichts Weiteres veröffentlicht (Abbildung 19).

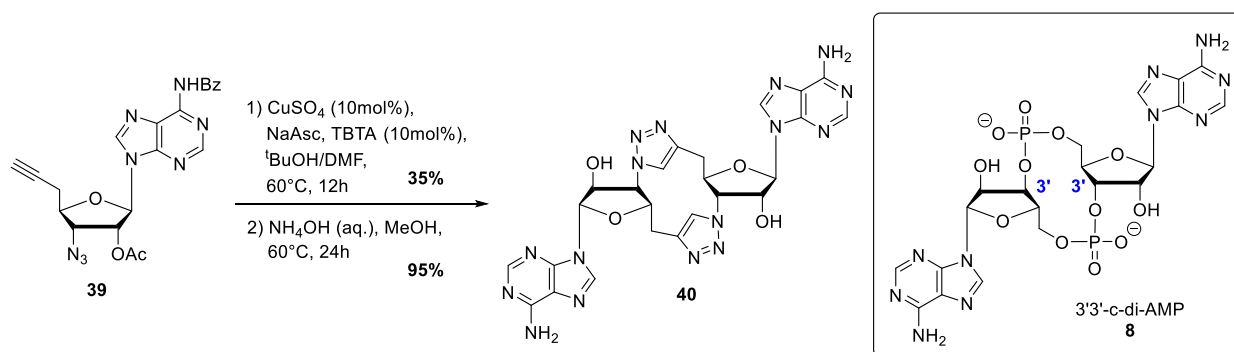


Abbildung 19: Synthese des zweifach triazolverknüpften CDNs **40**.^[123]

Neben Triazol-Verbrückungen sind auch Amidsurrogate für Phosphodiesterbindungen interessant. Für den Aufbau dieser Bindungsklasse werden speziell geschützte Säure- und Aminofunktionen benötigt. Sobald mehr als eine Amidverknüpfung in der Synthesestrategie vorkommen, ist eine überlegte Wahl der Schutzgruppenchemie von großer Bedeutung, um die Chemo- und Regioselektivität hoch zu halten. Ansonsten ist die Synthese nicht kontrollierbar. Das gilt auch für CDN-Analoga, die potentiell zwei Amidbrücken enthalten können.

Geeignete Nukleosid-Bausteine für die Synthese von neutral verknüpften CDNs sind aus den Arbeiten von Rozners et al.^[124-126] (**41** und **42**) und Robins et al.^[127] (**43**) bekannt (Abbildung 20). Die hybriden Nukleosid-Aminosäuren können als Monomere verwendet und zunächst an der Säurefunktion gekoppelt werden. Das kritische Amin ist währenddessen mit einer Schutzgruppe versehen (MMTr, Cbz) oder als Azid-Funktion maskiert. Dies verhindert eine ungeplante Nebenreaktion. Eine anschließende Freisetzung der Aminofunktion durch Säure (für MMTr) oder Hydrierung (für Cbz oder das Azid) ermöglicht eine selektive Fortführung der Reaktionssequenz. Dennoch ist das Vorgehen grundsätzlich komplex und benötigt teilweise eigens kreierte Synthese-Bausteine.

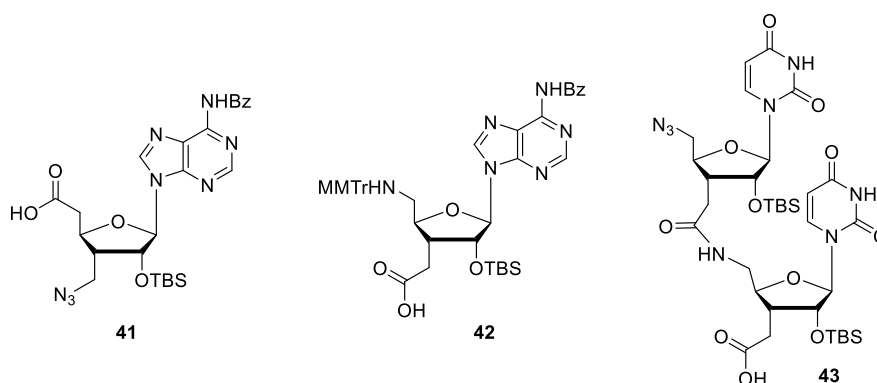


Abbildung 20: Bekannte hybride Nukleosid-Aminosäuren **41**, **42** und **43**.

In dem Zusammenhang publizierten Pal et al.^[128] das erste CDN, das über zwei reine Amidbindungen verbrückt wurde. Als wichtiges Intermediat wurde das Dimer **44** angegeben, das bereits durch eine Flüssigphasen-Peptidkupplung synthetisiert wurde. Durch Entschützen des Ethylesters und der Aminofunktion konnte der Zyklus **45** durch Makrolaktamisierung geschlossen werden. Ein wichtiges Beispiel für nachfolgende Arbeiten in Kapitel 4.2. Die doppelte Vorbrüggen-Glykosylierung der beiden Diacetat-Zentren erfolgte als abschließender Schritt mit Pyrimidin-Nukleobasen. Die beschriebene Methode erlaubt jedoch nur die Darstellung von symmetrischen Verbindungen, wie das Homodimer **46** mit Uracil (Abbildung 21). Für asymmetrische CDNs wie 2'3'-cGAMP muss eine alternative

Synthesestrategie gefunden werden, die die Einführung von zwei unterschiedlichen Nukleobasen ermöglicht.

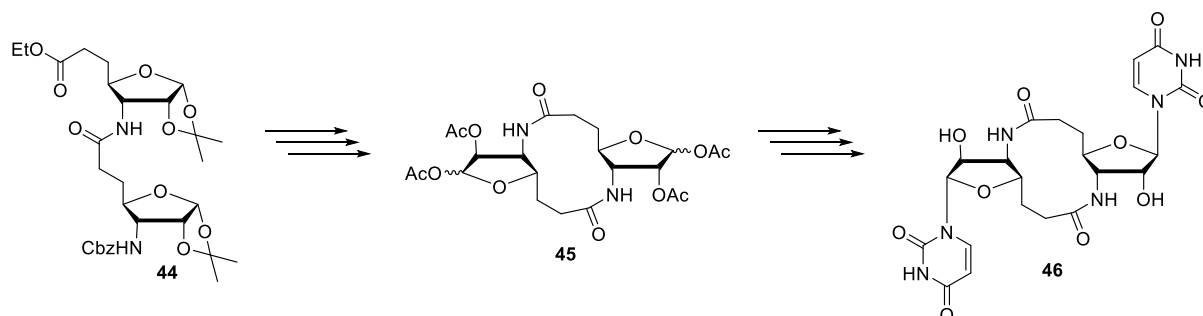


Abbildung 21: Synthese des doppelt amidverbrückten CDNs 46.^[128]

Zuletzt soll auf die Substitution von Phosphodiesterbrücken durch Carbamidstrukturen hingewiesen werden (Abbildung 22). Anwendung findet dies bei synthetischen Analoga von c-di-GMP (**48**, einem natürlichen *second messenger* in Bakterien).^[129] Das Molekül ist symmetrisch aufgebaut und die finale Ringschlussreaktion von Verbindung **47** läuft über die Reduktion der Azidfunktion mit anschließendem nukleophilen Angriff auf die benachbarte Thiocyanatgruppe. Im Gegensatz zu Triazol- oder Amidverbrückungen enthalten die Carbamidgruppen mehr H-Donoren und -Akzeptoren. Dies kann insbesondere für die Bindung in der Proteintasche ausschlaggebend sein. Das Carbamid **50** fungiert als Analogon für c-di-AMP (**8**) und wurde bereits vom Unternehmen *Innate Tumor Immunity, Inc.* patentiert. Untersuchungen als STING-Binder sind im Gange.^[130]

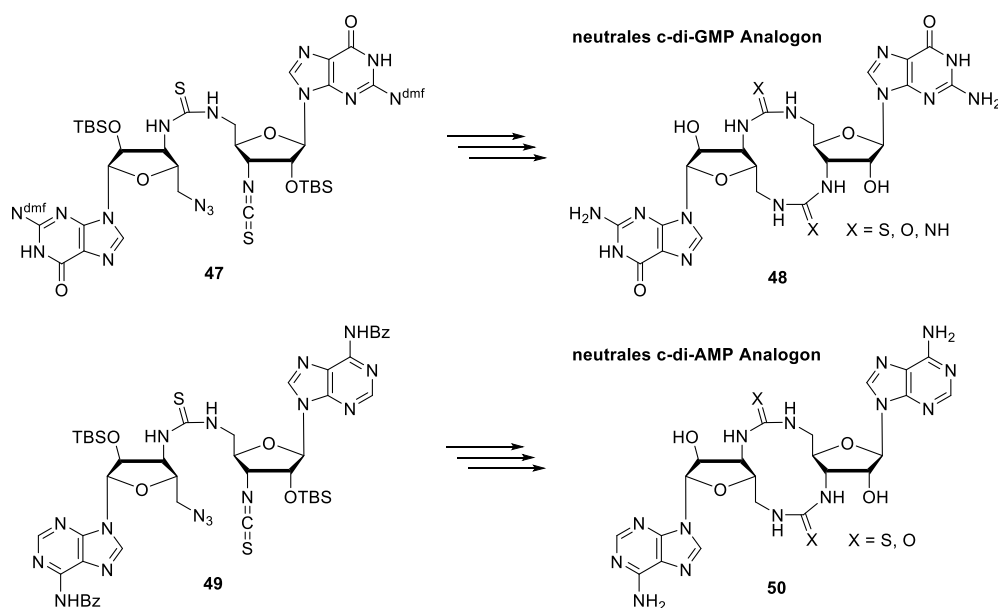


Abbildung 22: Synthese von neutralen geladenen c-di-GMP (**52**) und c-di-AMP (**54**) Analoga.^[129,130]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Literatur vielfältige Synthesestrategien für CDNs mit nicht-natürlichen 3'-5'-Verknüpfungen beschreibt. Synthetische Beispiele und Modifikationen für 2'-5'-verbrückte CDNs wie 2'3'-cGAMP sind derzeit nicht bekannt (Stand 2020). Die Hoffnung auf neutral geladene CDN-Analoga von 2'3'-cGAMP und deren therapeutische Wirkung ist jedoch groß.^[131]

1.7. Fluoreszierende Nukleotid-Analoga

Fluoreszenz ist eine bemerkenswerte Eigenschaft, die in der chemischen Biologie vielfach als Analysemethode genutzt wird. In der Zell-Mikroskopie können dadurch bestimmte Organellen wie der Zellkern (Träger der Erbinformation) oder das Zytoskelett (Stabilisator der Zellstruktur durch fadenförmige Proteine) mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt und voneinander differenziert werden.^[132-134] Proteine können beispielsweise durch Fusion mit GFP (*green fluorescing protein*)^[135] oder YFP (*yellow fluorescing protein*)^[136] visualisiert werden, DNA im Zellkern dagegen mit interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen wie z.B. durch DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, blau).^[137] Wichtige Metaboliten oder Proteine können außerdem mit speziellen organischen Farbstoffen versehen werden, die hohe Extinktionskoeffizienten, ausreichende Photostabilität, Absorption im sichtbaren Bereich des Lichts und hohe Lichtechtheit besitzen (z.B. Fluoresceine, Cyanine und Rhodamine).^[138,139] Bildgebende Verfahren wie die Konfokalmikroskopie liefern mithilfe dieser mächtigen Fluoreszenzeigenschaften unverzichtbare Informationen im Studium von Stoffwechselwegen in der Zelle.^[140,141] Die Größe der fluoreszenten Modifikation und deren Auswirkung auf die biologische Aktivität der zu untersuchende Substanz ist jedoch nicht zu vernachlässigen. Dies soll im Folgenden anhand von zwei Beispielen erörtert werden.

Für Actin spielt es als eines der wichtigsten und größten Zellproteine beispielsweise keine Rolle, ob am Proteinende ein sehr kleiner fluoreszierender GFP Anhänger angebracht ist. Als Teil des Zytoskeletts ist es beteiligt am dynamischen Auf- und Abbau des Zellgerüsts. Die lebenswichtige Polymerisation zu strukturellen Actin-Zellfasern ist im Falle des fluoreszierenden Actin-GFP-Fusionsproteins weiterhin gegeben. Dadurch kann dieser Zellprozess sehr gut im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden.^[142,143]

Je kleiner das Molekül jedoch wird, desto signifikanter wird der Einfluss einer Farbstoffmodifikation. Demnach ist ein Gleichgewicht zwischen notwendiger Modifikation und gewonnener Information zwingend zu berücksichtigen. Im Vergleich zum Protein Actin ist die Größe von 2'3'-cGAMP als *small molecule* äußerst gering. Selbst der Fluorophor GFP wäre um ein Vielfaches größer als 2'3'-cGAMP. Es würde keinen Sinn ergeben (und technisch zu anspruchsvoll sein) cGAMP mit GFP zu verknüpfen. Für die Sondierung von aktiven Proteinzentren, wie im Falle von cGAMP bei STING, müssen daher alternative Wege gefunden werden. Die fluoreszierende Modifikation sollte möglichst klein sein.

Das Unternehmen *BIOLOG Life Science Institute GmbH* verkauft seit 2015 Fluorescein gelabeltes 2'3'-cGAMP (**51** und **52**), wobei Linker und Fluorescein ca. 40 % der Gesamtmasse einnehmen (0.1 mg = 219 €).^[144] Biochemische Bindungsdaten mit STING oder Mikroskopieaufnahmen sind bisher noch nicht veröffentlicht und lassen damit die Frage offen, inwiefern die biologische Aktivität von cGAMP durch die deutlich größere Struktur beeinflusst wird (Abbildung 23).

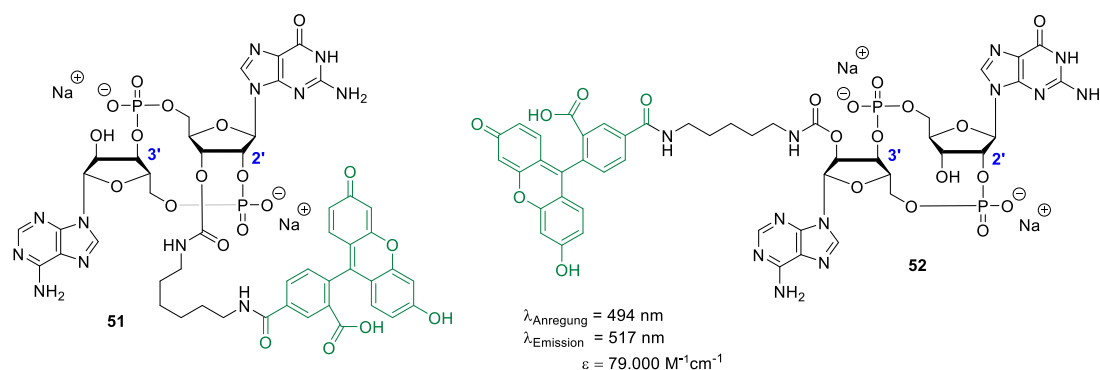


Abbildung 23: Fluorescein-gelabeltes 2'3'-cGAMP (51 und 52). Die Gesamtstruktur vergrößert sich signifikant.^[144]

Ein Vorteil von Fluoreszenzfarbstoffen wie Fluorescein ist, dass die Anregungs- (494 nm) und Emissionswellenlängen (517 nm) im sichtbaren Bereich liegen und damit zellschonend bezüglich Photoschäden sind – im Gegensatz zu ultravioletttem Licht. Photoschäden sind vor allem für unser Erbgut sehr gefährlich, da die Nukleotide der DNA durch energiereiches Licht unkontrollierte Reaktionen durchlaufen und Mutationen entstehen können (z.B. Oxidationsschäden oder Photo-Dimerisierungen von Thymidin-Nukleotiden).^[145] Außerdem verspricht der Extinktionskoeffizient von Fluorescein ($79.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis.

Zur Untersuchung des Abbaus von 2'3'-cGAMP entwickelten Kawaguchi et al.^[146] 2019 ein fluoreszierendes AMP-Analogon (**53**), modifiziert mit dem Farbstoff Tokyo Grün – einem Fluorescein-Farbstoff (Abbildung 24). Neben den ursprünglichen Substraten 2'3'-cGAMP (**1**) und ATP bindet die Verbindung **53** an die Hydrolase ENPP1 (siehe Kapitel 1.1).

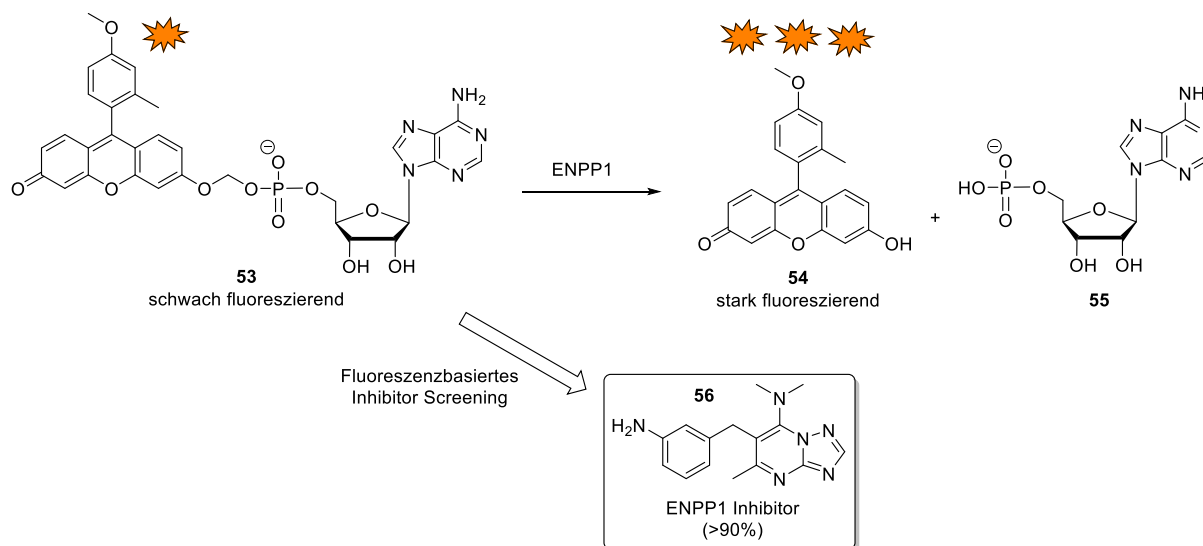


Abbildung 24: Die Fluoreszenz von Verbindung 53 spielt bei der Identifikation von ENPP1 Bindern wie Molekül 56 eine große Rolle. Adaptiert von Kawaguchi et al.^[146]

Die Hydrolyse des terminalen Fluoreszenzanhängers bewirkt eine Änderung der Fluoreszenzintensität zwischen kovalent gebundenem **53**, welches nur schwach fluoresziert ($\epsilon = 18.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), und dem nach der Hydrolyse abgespaltenem Farbstoff (**54**, stark fluoreszierend, $\epsilon = 75.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Diese Eigenschaft konnte in Inhibitor Screenings (Verdrängungsassays) eingesetzt werden, um aus einer Bibliothek von 9600 Verbindungen einen selektiven ENPP1-Binder (**56**) zu identifizieren ($\text{IC}_{50} = 0.48 \mu\text{M}$, >90 % Inhibierung). Anschließend konnte die neuentdeckte Verbindung **56** als Biomarker für das

Expressionslevel von ENPP1 in malignen Brustkrebszellen verwendet werden. Dies liefert aussagekräftige und schnelle Hinweise für die medizinische Rückfallquote. Zusätzlich sind bildgebende Verfahren auf Grundlage der Fluoreszenz möglich. Ein Vorteil mit ENPP1 ist, dass die Substrate nicht die Zellmembran penetrieren müssen, da die Phosphodiesterase auf der Zelloberfläche lokalisiert ist.^[147]

Allerdings kann die strukturelle Veränderung am Zielmolekül nicht vernachlässigt werden. Bindungseigenschaften und pharmakologische Wirksamkeit werden oft maßgeblich beeinflusst. Eleganter wäre der Ansatz, das Substratmolekül nur durch geringfügige Strukturveränderungen selbst fluoreszent werden zu lassen. Im Falle von 2'3'-cGAMP würde dies die Verwendung einer fluoreszierenden Nukleobase bedeuten.

Für Nukleotide sind viele fluoreszente Nukleobasen bekannt, die sich strukturell sehr nahe an den kanonischen Basen orientieren (Abbildung 25). Eine sehr alte und immer noch häufig verwendete Verbindung ist das 2-Aminopurin (**57**, AP).^[148] Die 6-Aminogruppe von Adenin wurde bei dieser Nukleobase zur 2-Position verschoben. Das so erzeugte Molekül hat passable Fluoreszenzausbeuten. Durch die Forschungsgruppe von Eric Kool an der Universität in Stanford entstanden viele weitere expandierte Ringsysteme von Nukleobasen wie z.B. die Substanzen **58** und **59**, die ebenfalls fluoreszierende Eigenschaften besitzen. Hauptfokus dieser Gruppe ist die biophysikalische Strukturuntersuchung von Nukleinsäuren und deren Interaktionen.^[149] Die Forschungsgruppe von Yitzhak Tor führte im Jahr 2011 ein fluoreszierendes RNA-Alphabet ein, das auf Thiophen- (**60**) und Thiazolderivaten (**61**) basiert und durch vergleichsweise hohe Extinktionskoeffizienten, gute Quantenausbeuten und einen starken Stokesshift auffällt.^[150,151]

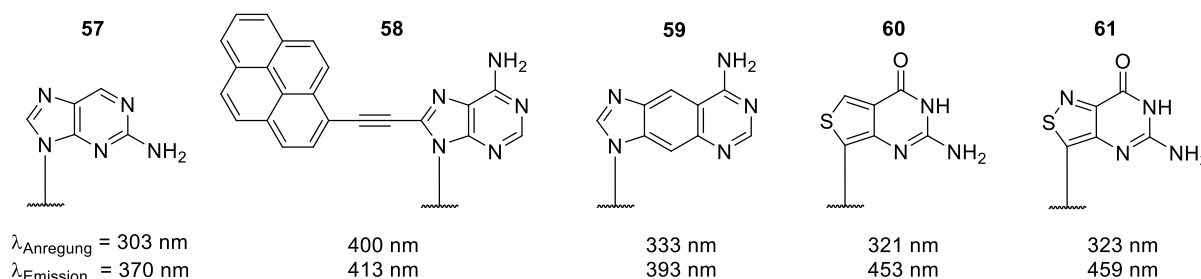


Abbildung 25: Beispiele für fluoreszierende Nukleobasen.

Roembke et al.^[152] kamen 2014 auf die Idee 2-Aminopurin (**57**) in CDNs wie 3'3'-cGAMP (**11**) einzubauen (Abbildung 26). Die Autoren berichteten, dass die resultierende fluoreszierende Deoxy-Variante 3'3'-cG(d2AP)MP (**62**) eine hohe Ähnlichkeit zu c-di-GMP (**7**) besaß und in Lösung und Anwesenheit von Mn^{2+} -Salzen mit c-di-GMP Heterodimere bildete. In diesen Aggregaten beobachteten sie eine Abnahme der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit unterschiedlicher c-di-GMP Konzentrationen. Außerdem bot sich Molekül **62** an, um den Abbauprozess durch die zugehörige Phosphodiesterase (PDE) zu verfolgen. Grund dafür ist eine Fluoreszenzänderung von offener und geschlossener Ringform, die quantifiziert werden kann. In geschlossenem Zyklus oder bei Dimerbildung treten π -stacking-Interaktionen zwischen den Purinbasen auf, die strahlungslose Relaxationen begünstigen. Bei linearen Verbindungen oder Monomeren ist dies deutlich weniger der Fall. Die Fluoreszenzintensität ist dadurch höher.

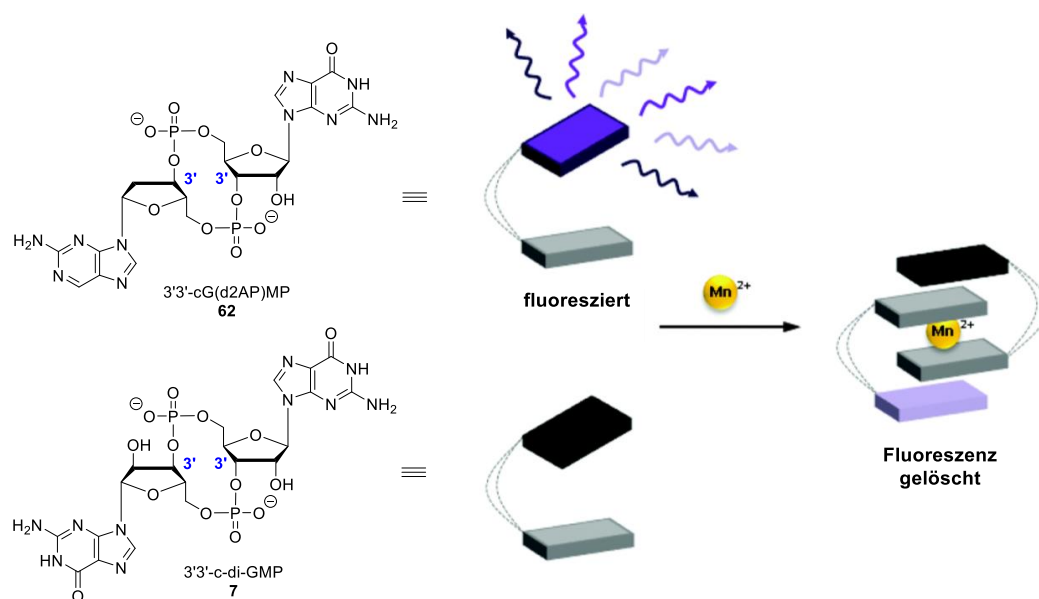


Abbildung 26: Verwendung von fluoreszierendem 3'3'-cG(d2AP)MP (62) als Sensor für c-di-GMP (7). Adaptiert mit freundlicher Genehmigung von Roembke et al.^[152] Copyright 2014 The Royal Society of Chemistry (RSC).

Die Anregungs- (310 nm) und Emissionswellenlängen (369 nm) von 3'3'-cG(d2AP)MP (62) liegen jedoch im UV-Bereich und ließen lediglich *in vitro* Messungen zu. Dennoch würde sich diese Molekülklasse auch zur Aktivitätsbestimmung von Zyklasten wie cGAS eignen, die am CDN-Aufbau involviert sind.

Ähnliche Studien mit 2-Aminopurin (57) führten Meehan et al.^[153] 2016 durch, indem sie die zwei Adeninbasen von c-di-AMP (8) komplett durch c-di-2AP (63) ersetzen. Die Synthese gelang durch eine enzymatische Zyklisierung (Abbildung 27). Sie beobachteten dann, dass der Abbau zu 64 mehr als doppelt so langsam verlief, da das Substrat 63 schlechter an die zugehörige Phosphodiesterase GdpP band. Es etablierte sich zunehmend die Methode CDNs mit einer fluoreszierenden 2-Aminopurin-Modifikation auszustatten.

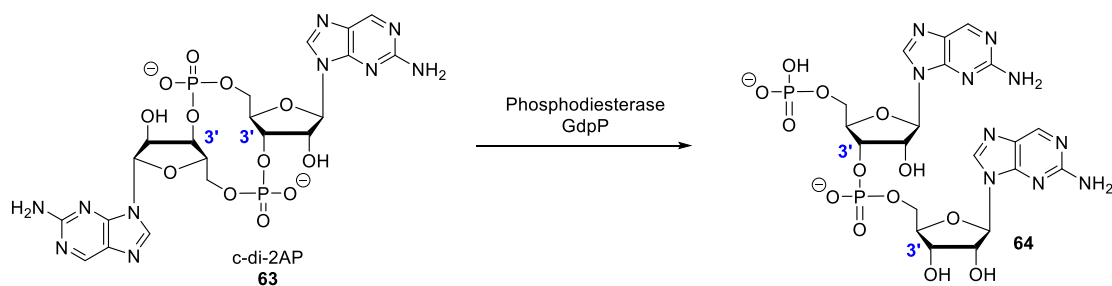


Abbildung 27: Abbau von fluoreszierendem c-di-AMP: c-di-2AP (63). AP = 2-Aminopurin.^[153]

Inwiefern 2-Aminopurin (57) Aufschluss über Stoffwechselprozesse im Zusammenhang mit 2'3'-cGAMP liefern kann – damit beschäftigte sich die Forschungsgruppe von Karl-Peter Hopfner an der LMU München im Jahr 2017. Sie setzten sich mit der Voraussage von Roembke et al.^[152] auseinander, dass 2-Aminopurin-modifizierte CDNs zur Aktivitätsbestimmung der zugehörigen Zyklasten genutzt werden könnten. Für 2'3'-cGAMP würde das die am Molekülaufbau beteiligte Zyklastase cGAS betreffen. Die Hopfner Gruppe konnte in einem ersten Schritt den Wirkmechanismus von cGAS aufklären und zeigen, dass cGAS und zytosolische DNA stabile Protein-DNA-Leitern in Lösung bildeten (Abbildung 28).^[154]

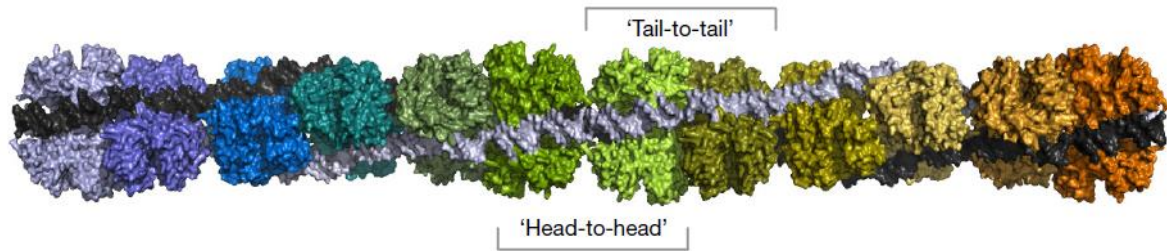


Abbildung 28: Kristallstruktur von cGAS-DNA-Leitern. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Andreeva et al.^[154] (Nature). Copyright 2017 Springer Nature.

Die Aktivität der DNA-induzierten 2'3'-cGAMP (**1**) Synthese hängt stark von der DNA-Länge selbst ab (und interessanterweise nicht von der Sequenz). Dies konnte bei *in vitro* Experimenten mit cGAS und DNA von unterschiedlicher Länge gezeigt werden. Das nötige Substrat ATP wurde durch seine fluoreszierende Variante mit 2-Aminopurin, fATP (**65**), ersetzt und die nachfolgende Synthese von fGAMP (**66**) verfolgt. Die relative Fluoreszenz nahm durch die Synthese von fGAMP (**66**) ab. Je länger die stimulierende DNA war, desto stärker verringerte sich auch die gemessene Fluoreszenz. Eine wesentliche Voraussetzung für diese Untersuchung war die Tatsache, dass cGAS die Variante fATP (**65**) als Substrat akzeptierte (Abbildung 29).

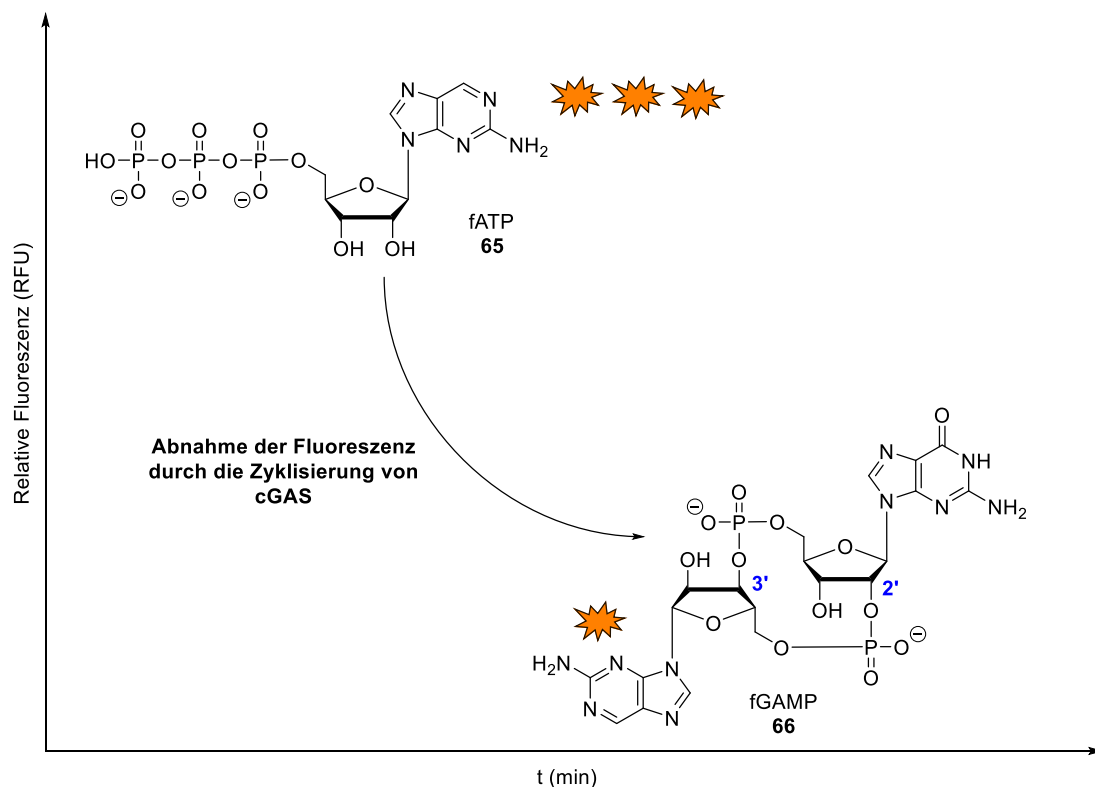


Abbildung 29: Die Aktivität von cGAS wurde unter anderem mit einem fluoreszierenden cGAMP-Analogon (**66**) bestimmt. Wichtig ist der Unterschied der Fluoreszenzintensität von Edukt (**65**, stark) und zyklisiertem Produkt (**66**, schwach). Adaptiert von Andreeva et al.^[154]

Um die Substratspezifität von cGAS genauer zu untersuchen, synthetisierten Novotná et al.^[155] (IOCB in Prag) auf enzymatischem Weg eine Bibliothek von 33 2'3'-CDNs (durch cGAS von Mensch, Maus und Huhn). Anschließend wurden die Bindungsaffinitäten (über DSF, *differential scanning fluorometry*) dieser Verbindungen an verschiedene STING-Haplotypen und die EC₅₀-Werte in HEK293T Reporter Zellen gemessen. Manche CDNs zeigten in dieser Struktur-Aktivitäts-Untersuchung ähnliche Werte wie

2'3'-cGAMP. Auch die fluoreszierende 2'3'-cGAMP-Variante mit einer thiophenbasierten Guanin-Nukleobase (**68**) konnte über das korrespondierende Triphosphat durch cGAS hergestellt werden (Abbildung 30). In dieser Forschungsarbeit wird diese Verbindung unter dem Akronym 2'3'-TorGAMP (**69**) geführt.

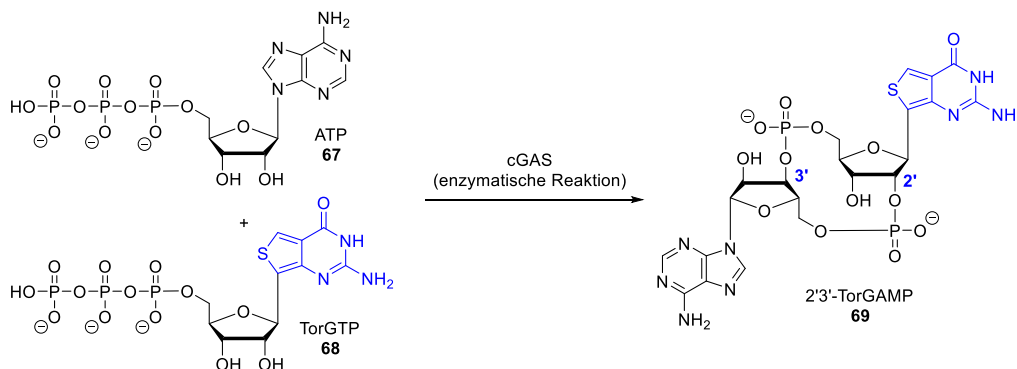


Abbildung 30: cGAS akzeptiert eine Reihe von nicht-natürlichen Substraten.^[155] Auch das fluoreszierende Thiophen-Nukleotid **68** von Yitzhak Tor kann für die Synthese einer fluoreszierenden 2'3'-cGAMP-Variante, 2'3'-TorGAMP (**69**), verwendet werden.

Zusammenfassend soll hervorgehoben werden, dass mithilfe der Fluoreszenz von CDNs wichtige biochemische Prozesse und Experimente untersucht werden können.

MOTIVATION

2. Motivation

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der Herstellung und Untersuchung von drei Derivaten von 2'3'-cGAMP (**1**, Abbildung 31): Ein amidverknüpftes Monophosphat Analogon (**70**, Kapitel 2.2), ein neutral geladenes Analogon (**71**, Kapitel 2.3) und eine fluoreszierende Variante (**69**, Kapitel 2.3). Die biologische Funktion des Naturstoffs **1** ist äußerst beeindruckend innerhalb der angeborenen Immunantwort. Gleichwohl ist die Anwendung als Arzneimittel problematisch, da die zweifach negative Ladung des cGAMP-Phosphatgerüsts eine schlechte Permeation durch Zellmembranen nach sich zieht.^[156,157] Für die effizienteste Aktivierung der STING-Entzündungskaskade ist ein Vordringen in das Zytosol der Zelle bzw. das endoplasmatische Retikulum zwingend erforderlich.

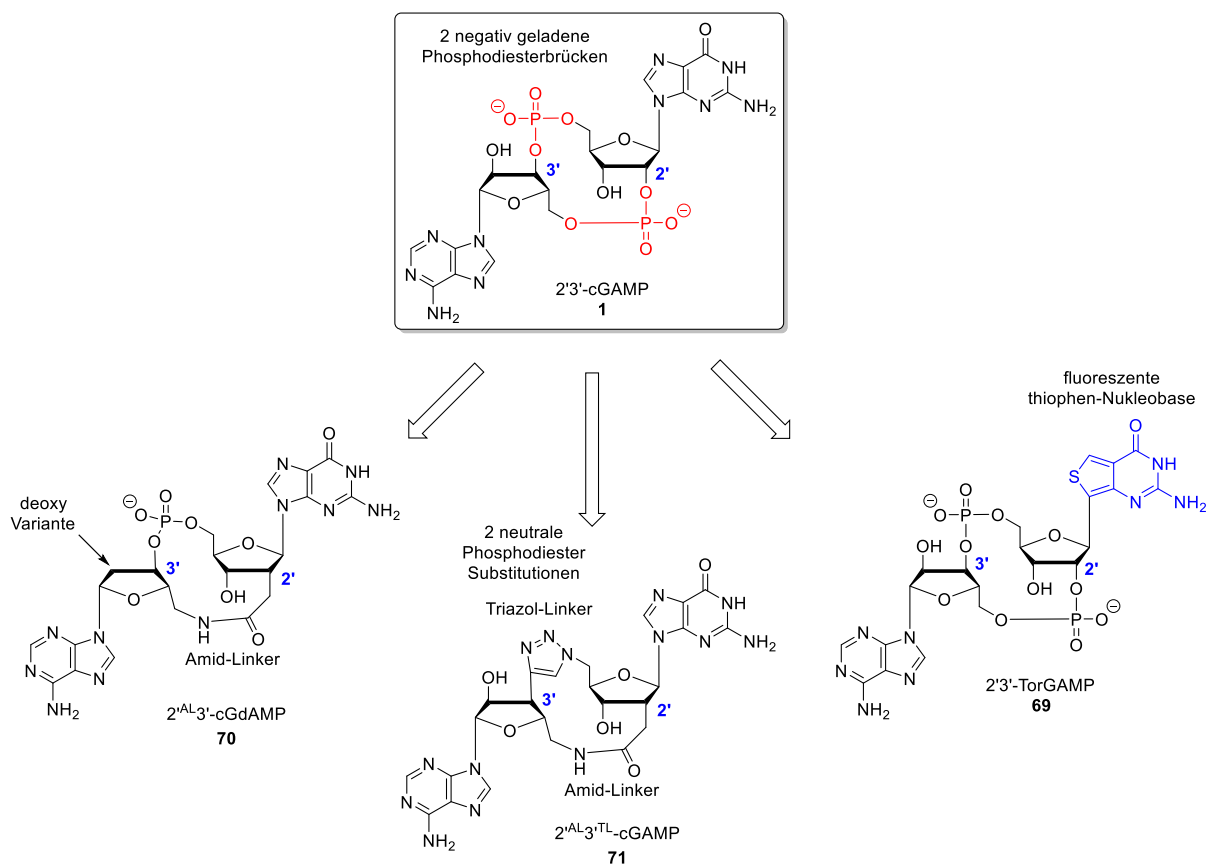


Abbildung 31: Diese Forschungsarbeit konzentriert sich auf die Synthese von drei 2'3'-cGAMP-Analoga. AL = Amid-Linker, TL = Triazol-Linker.

Im Labor kann die zelluläre cGAMP-Aufnahme aus dem Medium durch Transfektionsmittel (z.B. Lipofectamin oder Digitonin) deutlich erleichtert werden. Auch längere Expositionszeiten wirken sich positiv auf das Eindringen aus. Doch die generellen Anforderungen von Arzneimitteln bei der Anwendung in höheren Organismen sind damit nur sehr schlecht erfüllt. Außerdem ist die Hydrolyseempfindlichkeit der Phosphodiestergruppen ein Problem für die Persistenz und Bioverfügbarkeit. Unter den vielversprechendsten cGAMP-Derivaten in klinischen Tests befinden sich daher sogenannte Phosphorothioat-Analoga (siehe Kapitel 1.4), die durch eine Schwefelsubstitution verbesserte physikochemische Eigenschaften aufweisen. Neben der passiven Diffusion durch die Zellmembran muss auch die Möglichkeit einer aktiven Aufnahme durch spezielle Rezeptoren in Betracht gezogen werden.

Erste Hinweise auf spezifische Importerkanäle für CDNs wie cGAMP wurden 2019 in der Tat publiziert. Es bleibt jedoch abzuwarten, welche Rolle diese bei der gezielten STING-Stimulation durch cGAMP einnehmen.^[24]

Die Fragestellung dieser Forschungsarbeit befasst sich unter anderem damit, ob eine oder zwei Phosphodiesterbindungen von 2'3'-cGAMP durch neutral geladene Brücken ersetzt werden können. Bei Triazol- und Amidverknüpfungen gibt es anhand von Publikationen Anzeichen, dass diese sogar von Polymerasen toleriert und abgelesen werden können. Während Amidbindungen eine Flexibilität vergleichbar zu Phosphodiestern besitzen, ist die Triazol-Einheit ein eher starres Verbindungsglied. Ein entscheidender Vorteil ist jedoch der synthetische Zugang. Die CuAAC Chemie ist durch ausgezeichnete Chemoselektivität gekennzeichnet. Ein nicht zu vernachlässigender Befund in Anbetracht der herausfordernden Schutzgruppenchemie von Nukleosiden.

Wie wichtig eine sehr ähnliche Konformation des neutral geladenen Analogons zur Ausgangsverbindung cGAMP sein könnte, zeigt sich schon in den großen Unterschieden der Bindungsaffinitäten innerhalb der vier möglichen cGAMP-Konstitutionsisomere (siehe Kapitel 1.2). Die Ringspannung des verbrückten Makrozyklus und die Vergleichbarkeit des Konformationsraums ist deshalb von fundamentaler Bedeutung. Erhöht sich allerdings die Zellpermeabilität und Hydrolysebeständigkeit der synthetisierten Analoga, kann auch eine etwas schlechtere Bindung an STING in Kauf genommen werden, da der Gewinn an anderer Stelle sichtbar wird (z.B. kleinerer IC₅₀-Wert, aber höherer EC₅₀-Wert).

Des Weiteren sollte eine fluoreszierende Variante von cGAMP untersucht werden: 2'3'-TorGAMP (**69**). Die Substitution der Guanin-Nukleobase mit einem strukturell ähnlichen aber fluoreszierenden Thiophen-Baustein birgt gewinnbringende Eigenschaften. Räumlich sehr nahe Nukleobasen fördern das Löschen der Fluoreszenz und begünstigen strahlungslose Relaxationsprozesse.^[150,158] In Bezug auf die Protein-Ligand-Bindung kann diese Änderung der Fluoreszenzintensität wichtige Informationen über die Bindungsaffinität liefern. Mithilfe von Verdrängungsexperimenten können potenziell neue STING-Binder auf Grundlage der Fluoreszenzänderung von gebundenem zu freiem Zustand identifiziert werden. Basierend auf der Verfügbarkeit von **69** sollte dann eine mögliche Anwendung für mikroskopische Bildgebungsverfahren entwickelt werden.

3. Syntheseplanung

3.1. Ein amidverknüpftes Monophosphat-Analogon

Die Chemie von CDNs soll besser verstanden werden, indem zunächst nur eine Phosphodiesterbrücke durch einer Ester- (**72**) oder Amidbindung (**71**) ersetzt wird (Abbildung 32). Dafür bietet sich die 2'-5'-Verknüpfung an, denn dadurch können kommerzielle oder literaturbekannte Adenosin-Bausteine (**74** oder **78**) in die Syntheseplanung einbezogen werden. Zur Vereinfachung der Schutzgruppenchemie und als Machbarkeitsstudie wurden dafür zunächst die Deoxy-A-Varianten gewählt. Das Schlüsselintermediat stellt der G-Baustein (**75**) dar, der auch für spätere Syntheserouten ein nützlicher Vorläufer sein sollte. Dieser enthält eine Alkoholgruppe für die spätere Phosphodiesterbrücke und eine benzylgeschützte Säurefunktion. Die Verbindung lässt sich aus D-Arabinose (**77**) modular herstellen.

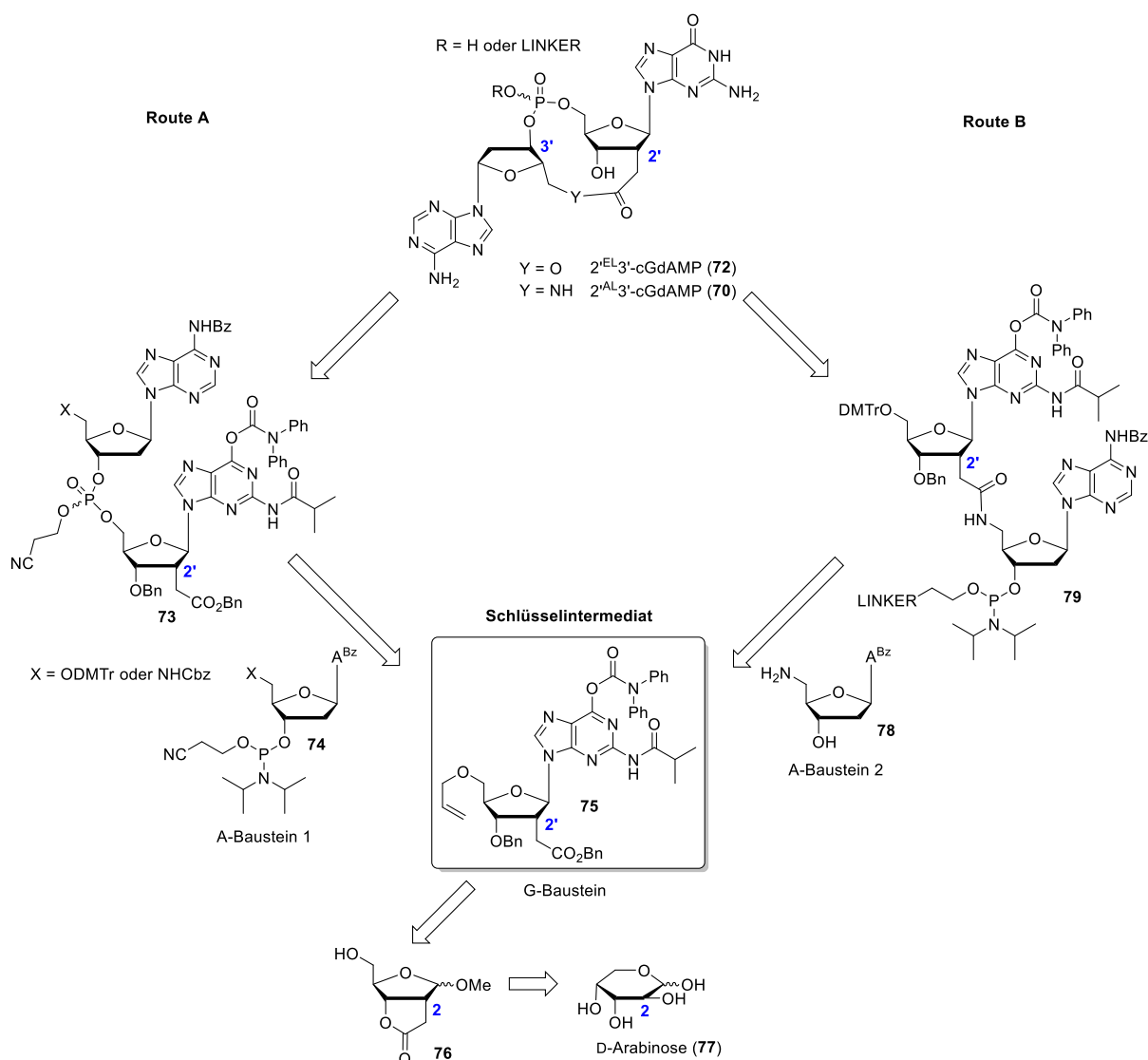


Abbildung 32: Zwei Strategien für die Synthese der Monophosphat-Analoga **70** und **72** über das Schlüsselintermediat **75**. Route A läuft über das lineare Phosphat-Intermediat **73**, Route B über das lineare Peptid-Intermediat **79**. EL = Ester-Linker, AL = Amid-Linker, A = Adenosin, G = Guanosin.

Amidbindungen sind erprobte Phosphat-Substitutionsmotive^[159,160] und eignen sich hervorragend für Ringschlussreaktionen (z.B. bei der Synthese von zyklischen Peptid-Antibiotika).^[161,162] Daher sollte in Route A das Dinukleotid **73** zuerst über das Flüssigphasen-Phosphoramidit-Verfahren linear verknüpft und anschließend über eine Makrolaktamisierung zyklisiert werden. Alternativ wird auch eine Makrolaktamisierung versucht, da die Anzahl der Syntheseschritte geringer wäre. Die Verseifungs- und damit Zersetzungseigenschaften der Zielverbindung wären jedoch potenziell begünstigt.

In Route B sollte die Synthesestrategie in genau umgekehrter Reihenfolge über das Amid-Intermediat **79** verlaufen. Der Vorteil wäre, dass die abschließende Phosphat-Zyklisierung die Einführung eines Linkers ermöglicht, welcher eine spezielle Maskierung des negativ geladenen Restes erlauben würde. Für *prodrug*-Ansätze wäre dies interessant, wenn der Linker innerhalb der Zelle enzymatisch abgespalten wird.

3.2. 2'^{AL}3'^{TL}-cGAMP: Ein neutral geladenes 2'3'-cGAMP-Analogon

In einem weiteren Ansatz sollten beide cGAMP-Phosphodiesterbrücken mit jeweils einer Triazol- und einer Amidverknüpfung substituiert werden (Abbildung 33). Die erhaltene Cyclophan Verbindung **71** repräsentiert ein neutral geladenes Molekül. Die Sharpless Click Chemie (CuAAC) eignet sich ideal, um chemoselektiv aus G- (**81**) und A-Vorläufer (**82**) ein lineares Dinukleotid zu generieren. Der Zugang zum finalen Zyklus sollte analog zum Monophosphat-Ansatz über eine Makrolaktamisierung erfolgen. Durch angemessene Schutzgruppenstrategien könnten die G- und A-Bausteine aus kommerziell erhältlichen Zuckern wie D-Arabinose (**77**) und D-Xylose (**84**) zusammengesetzt werden.

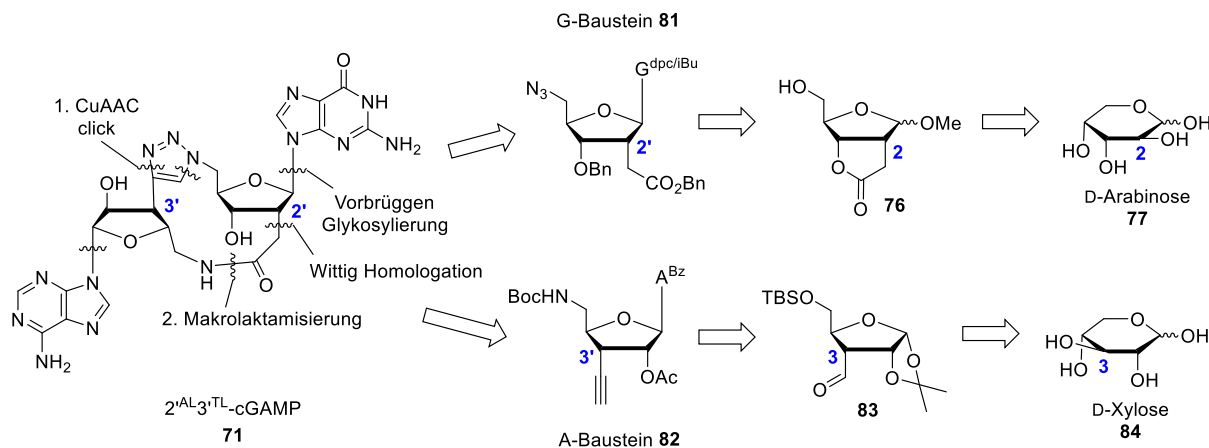


Abbildung 33: Synthesestrategie für das triazol- und amidverknüpfte cGAMP-Analogon **71**. AL = Amid-Linker, TL = Triazol-Linker.

3.3. 2'3'-TorGAMP: Ein fluoreszierendes 2'3'-cGAMP-Analogon

Die fluoreszierende Variante 2'3'-TorGAMP (**69**) sollte mithilfe des A-Phosphoramidits (**85**, bekannt aus RNA-Synthese-Protokollen) und eines besonderen G-Allylphosphatesters (**86**) konstruiert werden (Abbildung 34).

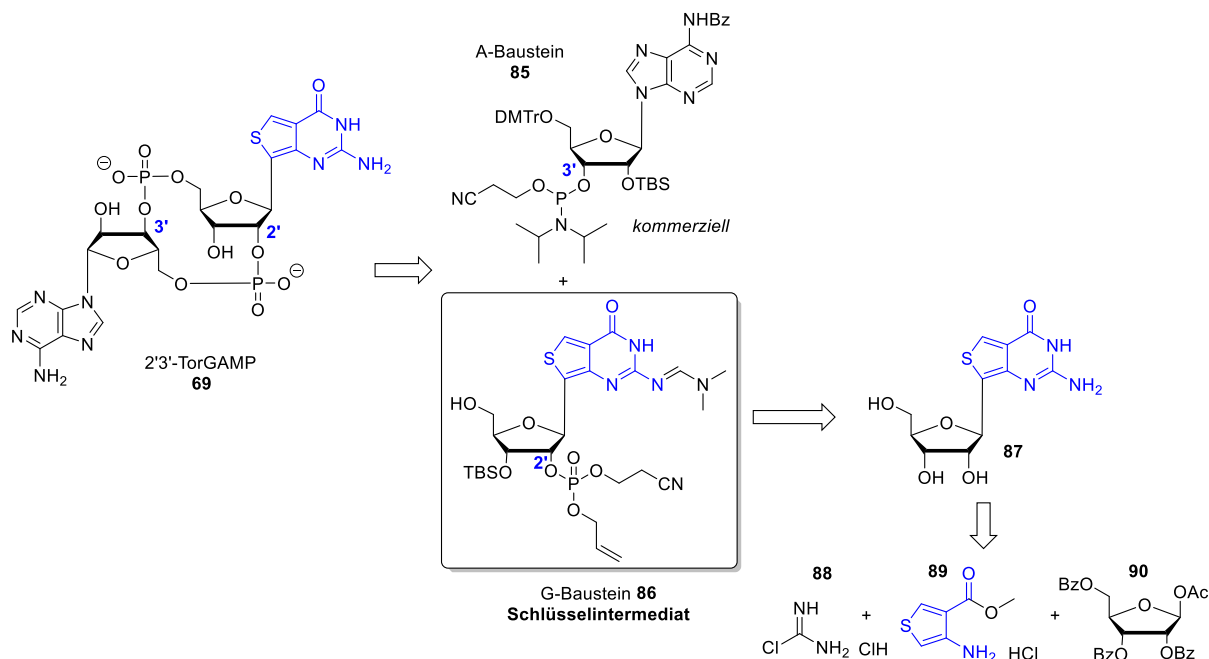


Abbildung 34: Synthesestrategie von 2'3'-TorGAMP (**69**). Schlüsselintermediat ist G-Baustein **86**. Die Bestandteile der fluoreszierenden Nukleobase sind blau markiert.

Yitzhak Tor berichtete bereits wichtige Vorarbeiten für die Phosphoramidit-Synthese des fluoreszierenden Thiophen-Nukleosids (**87**), sodass diese Verbindung aus kommerziell erhältlichen Substanzen (**88**, **89** und **90**) gewonnen werden kann.^[150] Darauf aufbauend sollte das Schlüsselintermediat **86** synthetisiert werden. Eine geeignete und schonende Phosphatzyklisierung sollte dann zum Zielmolekül führen.

RESULTATE UND DISKUSSION

4. Resultate und Diskussion

4.1. Synthesen zum amidverknüpften Monophosphat-Analogon

Aus dem Zucker D-Arabinose (**77**) wurde das Benzyl- und Isopropyliden-geschützte Derivat **91** gewonnen, um selektive Veränderung an der 2-Position vornehmen zu können (Abbildung 35). Nach einer Swern Oxidation und Wittig Homologisierung mithilfe des geeigneten Ethylesters **92** konnte das erhaltene Olefin **93** mit Raney-Nickel und Wasserstoff diastereoselektiv zu Verbindung **94** mit *R*-Konfiguration reduziert werden. Die Isopropyliden-Gruppe nimmt in dieser Reaktion eine dirigierende Funktion ein. Durch das anschließende Entfernen der Benzyl- und Isopropylidenschutzgruppe über Hydrierung und Hydrolyse wurde unter sauren Bedingungen (kat. H_2SO_4) das Lakton **76** geformt. Die selektive Bildung des kinetischen Furanoseprodukts wurde durch niedrige Temperaturen begünstigt (gegenüber dem thermodynamisch favorisierten Pyranosering). Nach Tosylierung wurde ein kristallines Derivat erhalten. Eine Kristallstrukturanalyse lieferte den Beweis für die Struktur von **76**.

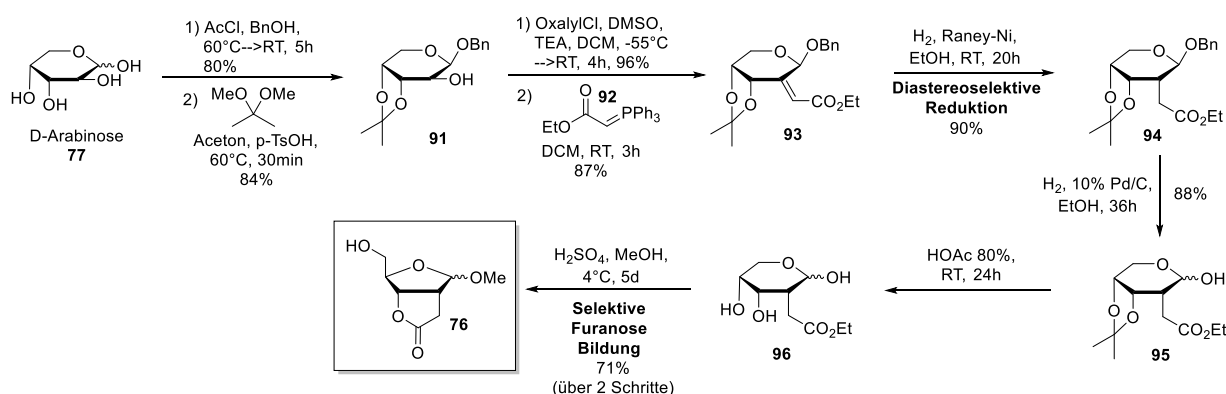


Abbildung 35: Synthese des Laktons **76** als wichtiger Vorläufer des Guanosin-Bausteins **75**.

Die Synthese des G-Bausteins **75** erfordert eine besondere Alkoholschutzgruppe an der 5-Position (Abbildung 36). Das Studium der einschlägigen Literatur von *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*^[163] lässt nicht allzu viele Möglichkeiten zu, die mit den vorhandenen Schutzgruppen kombiniert werden können.

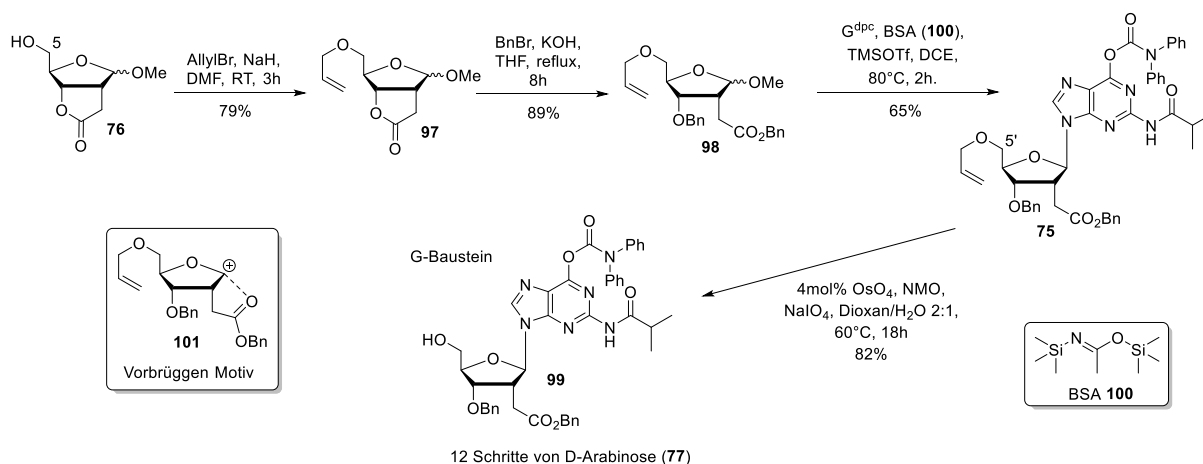


Abbildung 36: Synthese des Schlüsselintermediats **99**. BSA = Bis(trimethylsilyl)acetamid, DCE = Dichlorethan.

Eine Allylschutzgruppe mit OsO₄-Abspaltung nach Kitov et al.^[164] bietet eine Lösung. Zunächst wird die freie Alkoholfunktion von Molekül **76** mit einer Allylschutzgruppe versehen und der Laktoring unter basischen Bedingungen geöffnet und benzylgeschützt (**98**). Die Glykosylierungsreaktion zu **75** läuft unter Standard Vorbrücken-Bedingungen (BSA **102**, TMSOTf) in 65 % Ausbeute. Die Benzylesterfunktion nimmt hierbei einen mutmaßlichen β -selektiven Nachbargruppeneffekt über Übergangszustand **101** ein. Das finale Entfernen der Allylfunktion zu **99** erfolgte durch zweifache OsO₄-katalysierte Bishydroxylierung und nachfolgender oxidativer Spaltung durch NaIO₄. Die restlichen funktionalen Gruppen blieben bei diesem Prozedere unberührt. Gängige Allyl-Entschützungsverfahren nach Tsukamoto et al.^[165] mit Pd(PPh₃)₄ und Dimethylbarbitursäure blieben wirkungslos.

Die weitere Fusion mit dem kommerziellen dA^{Bz}-Phosphoramidit **102** zu Dinukleotid **104** geschah über ein gängiges Flüssigphasensyntheseprotokoll^[166] mithilfe von Tetrazol (**103**) und Iod in 66 % Ausbeute (Abbildung 37). Dies ergab ein untrennbares Gemisch aus zwei Phosphodiester-Diastereomeren. Die DMTr-Schutzgruppe wurde sauer zu Verbindung **106** abgespalten, während die Säuregruppe an der 2'-G-Position durch eine Palladium-katalysierte Hydrierung zu **107** entschützt wurde. Verbindung **107** konnte jedoch nicht isoliert und analytisch identifiziert werden. Lediglich eine niedrigaufgelöste Masse wies auf das Entstehen dieser Zyklusvorstufe hin. Eine weitere Yamaguchi-Makrolaktonisierung mit dem Rohprodukt aus der vorherigen Reaktion und Trichlorbenzoylchlorid in Richtung Zielmolekül **72** scheiterte.^[167,168]

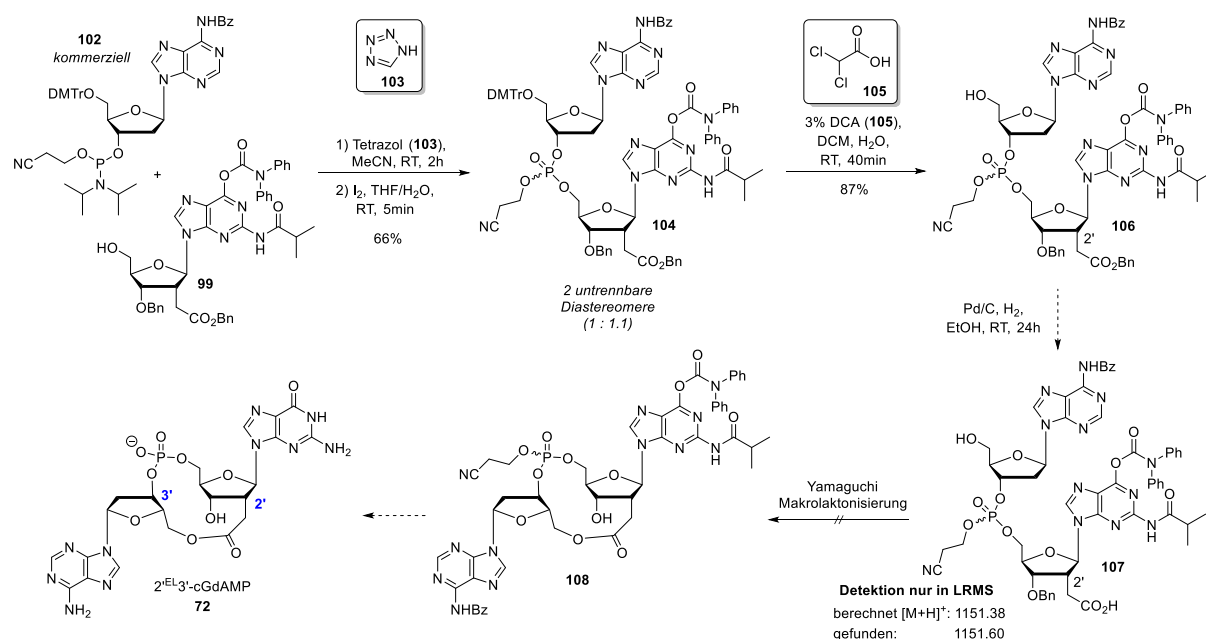


Abbildung 37: Syntheseansatz der Makrolaktonisierung von Dinukleotid 107. DCA = Dichloressigsäure.

Der Syntheseansatz der Makrolaktonisierung zu Lakton **72** wurde als Machbarkeitsstudie durchgeführt. Daher wurde vor allem getestet welche Herausforderungen während des Monophosphat-Aufbaus aufkommen würden und welche Schutzgruppenchemie geeignet wäre. Ein weiterführender Ansatz sollte den synthetischen Zugang zu einem amidverknüpften Monophosphat **70a** ermöglichen. Der synthetische Aufwand im Gegensatz zum vorangegangenen Laktonansatz würde sich jedoch erhöhen, da ein essentieller Baustein (**115**, dA^{Bz}-Phosphoramidit mit Aminofunktion) erst synthetisiert werden müsste und nicht wie Verbindung **102** kommerziell erworben werden könnte (Abbildung 38). Für die biologische Evaluierung wird jedoch angenommen, dass amidverknüpfte

Monophosphate wie **70a** besser geeignet wären als Lakton Analoga (**72**), da die Hydrolyseempfindlichkeit sinken würde.

Die Synthese des A-Bausteins startete mit einer doppelten Benzoylschätzung nach Zhu et al.^[169] zu **109**. Mesylierung, Azidierung (**111**) und Hydrierung führten unter Abspaltung einer Benzoylgruppe nach Reddy et al.^[170] die Aminofunktion in Verbindung **113** ein, die anschließend Cbz-geschützt wurde. Die Reaktion mit CEDCI (**114**) lieferte das nötige Amino-Phosphoramidit **115**.

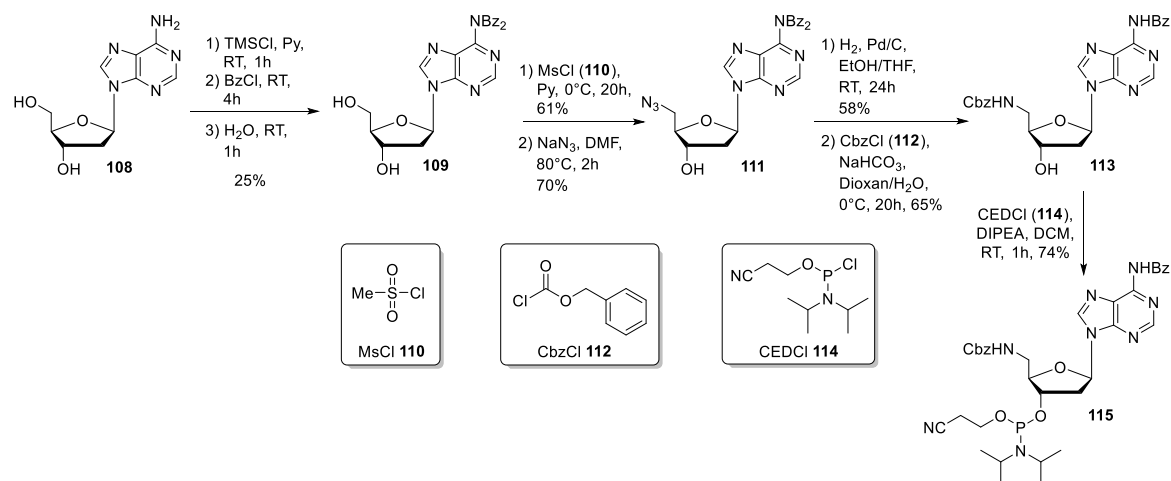


Abbildung 38: Synthese von Amin Derivat **115** des dA^{Bz}-Phosphoramidits. MsCl = Methansulfonylchlorid, CbzCl = Chlorameisensäurebenzylester. CEDCI = 2-Cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit.

Der A-Baustein **115** wurde mit dem bereits verwendeten G-Baustein **99** (aus Abbildung 36) unter Phosphoramiditchemie in 57 % Ausbeute zusammengeführt (Abbildung 39). Das Diastereomergemisch des Dinukleotids **116** stellt somit eine speziell modifizierte Aminosäure dar, die unter reduktiven Bedingungen zu **117** entschützt werden kann – im Idealfall simultan in einem einzigen Schritt.

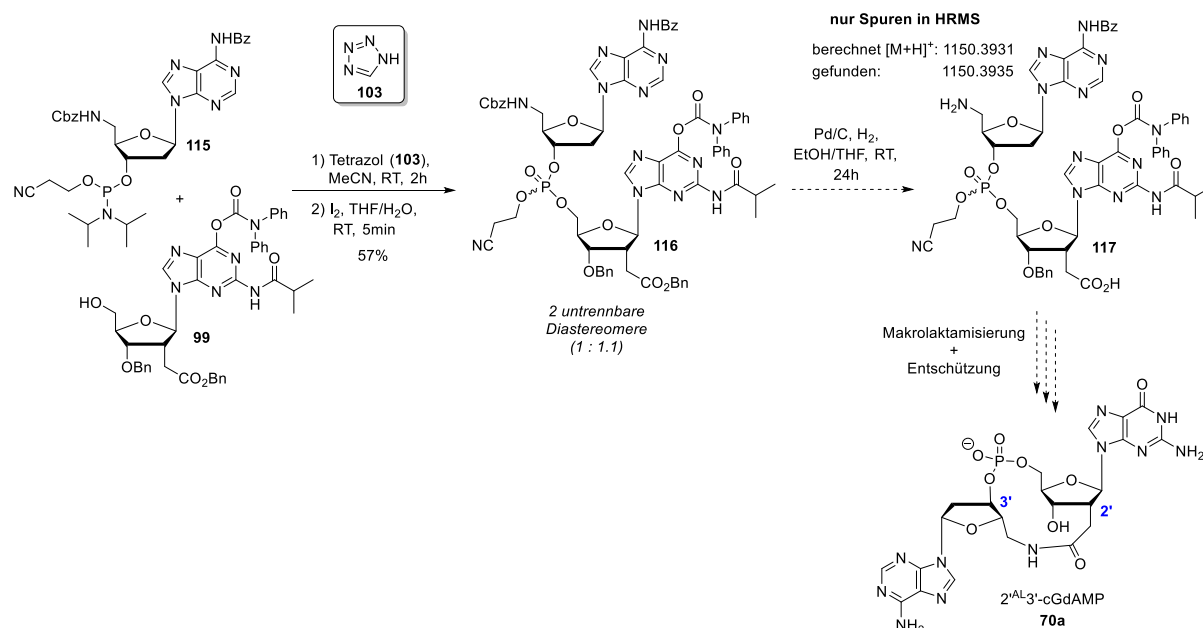


Abbildung 39: Syntheseansatz der Makrolaktamisierung von Dinukleotid **116**.

Die freigesetzte Amin- und Säurefunktion von **117** sollte in der Lage sein durch eine HATU vermittelte Makrolaktamisierung den Ringschluss zu vollziehen. Doch Aminosäure **117** wurde bei einer Palladium-katalysierten Hydrierung nur in Spuren detektiert, sodass nachfolgende Reaktionen hin zu Zielverbindung **70a** nicht möglich waren.

In Route B sollte das lineare Dinukleotid **79** zunächst durch eine Amidbindung verknüpft und hinterher über Phosphoramiditchemie zyklisiert werden. Dazu wurde der G-Baustein **99** DMTr-geschützt und der Benzylester **118** unter reduktiven Bedingungen zu **119** entschützt (Abbildung 40). Der Umsatz der Pd/C-Hydrierung wurde über LCMS verfolgt.

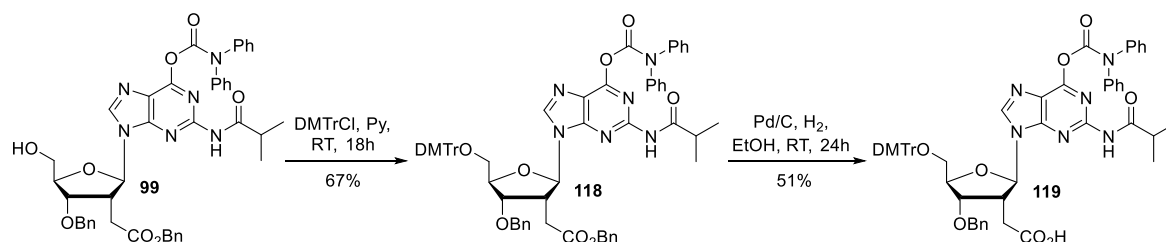


Abbildung 40: Synthese von Säure-Vorläufer **119**.

Die rohe Säure **119** wurde direkt mit Amino-dA^[170] **120** versetzt und über Nacht mit HATU gerührt (Abbildung 41). Die Bildung einer neuen Verbindung konnte über Dünnschichtchromatographie klar gezeigt werden. Allerdings konnte Dinukleotid **121** durch Säulenchromatographie nicht isoliert werden und das Rohprodukt wurde nur in Spuren durch hochaufgelöste Massenspektrometrie detektiert.

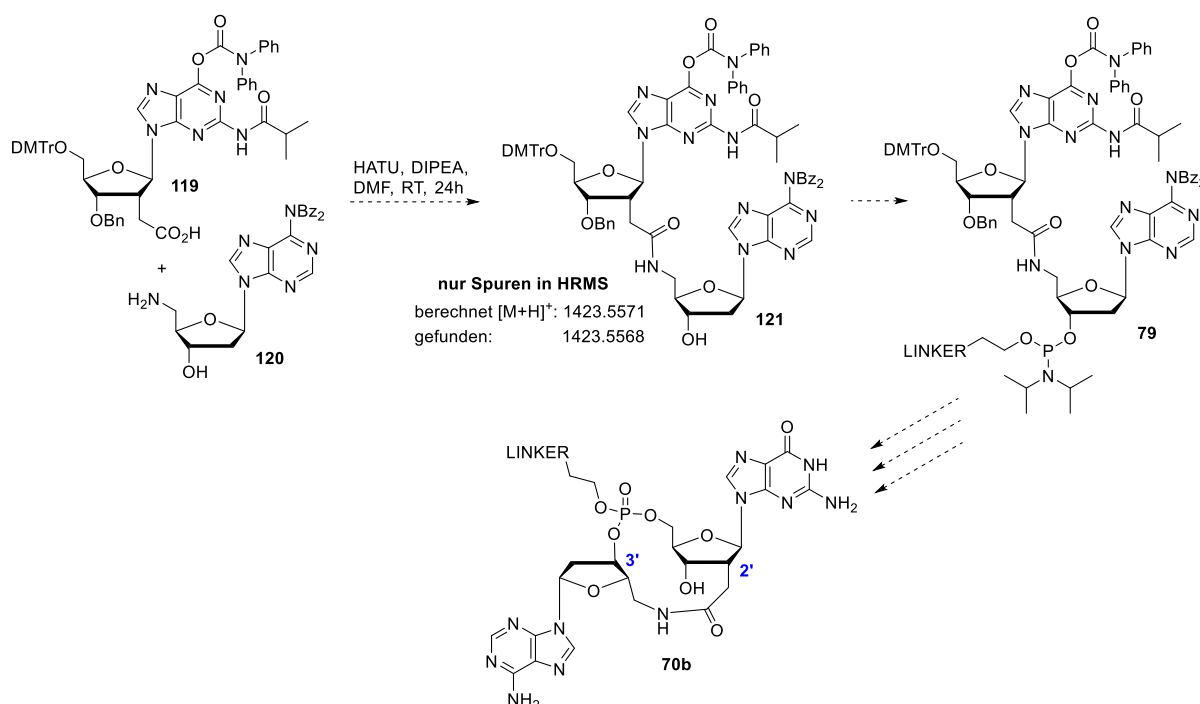


Abbildung 41: Synthesansatz einer Amidkupplung zu Dinukleotid **121**. Eine Phosphorzyklisierung könnte zu Zielverbindung **70b** führen.

Die Synthesansätze für die unterschiedlichen cGAMP-Monophosphat-Analoga **72**, **70a** und **70b** waren nicht erfolgreich. Die Schutzgruppenchemie und Synthesestrategie erwiesen sich als zu kompliziert, weswegen diese Ideen nicht weiterverfolgt werden konnten. Die gewonnen Erkenntnisse waren für die nachfolgenden cGAMP-Analoga in Kapitel 4.2 und 4.3 von entscheidender Bedeutung.

4.2. 2'^{AL}3'^{TL}-cGAMP: Ein neutral geladenes 2'3'-cGAMP-Analogon

4.2.1. Synthese und Evaluierung der Bindung an STING

Die Arbeiten zu einem neutral geladenem cGAMP-Analogon 2'^{AL}3'^{TL}-cGAMP (**71**) wurden bereits veröffentlicht und sind mit freundlicher Genehmigung der Autoren auf den folgenden Seiten dargestellt (Copyright 2019 Jon Wiley and Sons).

A Click-Chemistry Linked 2'3'-cGAMP Analogue

Clemens Reto Dialer, Samuele Stazzoni, David Jan Drexler, Felix Moritz Müller, Simon Veth, Alexander Pichler, Hidenori Okamura, Gregor Witte, Karl-Peter Hopfner, Thomas Carell*

Chem. Eur. J. **2019**, 25, 2089-2095.

Mein Beitrag war die Konzeption der Syntheseroute und die anschließende Synthese und Charakterisierung aller Verbindungen. Außerdem die Mitverfassung des Manuskripts.

Nucleotide Analogues

A Click-Chemistry Linked 2'3'-cGAMP Analogue

Clemens Reto Dialer,^[a] Samuele Stazzoni,^[a] David Jan Drexler,^[b] Felix Moritz Müller,^[a] Simon Veth,^[a] Alexander Pichler,^[a] Hidenori Okamura,^[a] Gregor Witte,^[b] Karl-Peter Hopfner,^[b] and Thomas Carell^{*[a]}

Abstract: 2'3'-cGAMP is an uncanonical cyclic dinucleotide where one A and one G base are connected via a 3'-5' and a unique 2'-5' linkage. The molecule is produced by the cyclase cGAS in response to cytosolic DNA binding. cGAMP activates STING and hence one of the most powerful pathways of innate immunity. cGAMP analogues with uncharged link-

ages that feature better cellular penetrability are currently highly desired. Here, the synthesis of a cGAMP analogue with one amide and one triazole linkage is reported. The molecule is best prepared via a first Cu^I-catalyzed click reaction, which establishes the triazole, while the cyclization is achieved by macrolactamization.

Introduction

Cyclic dinucleotides (CDNs) are important cellular messenger molecules in a variety of organisms.^[1] The compounds play a crucial role in a wide range of biological processes, such as signal transduction, control of biofilm formation or quorum sensing.^[2] Bacteria produce molecules in which two purine bases are linked via two 3'-5' phosphate linkages to give symmetrical cyclophane structures.^[3] One main example for such a molecule is the c-di-GMP compound **1** shown in Figure 1.^[4,5] Biochemically, the compound is generated from the corresponding nucleotide-5'-triphosphates. Recently, an unsymmetrical cyclic dipurine molecule (cGAMP, **2**) was discovered in mammalian cells.^[6,7] In this molecule, the two purines are connected via one 3'-5' and another 2'-5' linkage.^[8] The dinucleotide **2** is assembled by the cyclase cGAS (cyclic GMP-AMP synthase). cGAS is a cytosolic DNA sensor and part of the innate immune system.^[9,10] 2'3'-cGAMP (**2**) binds to the transmembrane receptor STING (stimulator of interferon genes) with nanomolar affinity ($K_d = 4.59$ nM),^[11] which activates the type 1 interferon (IFN) pathway.^[12–14] Subsequent degradation of cGAMP **2** occurs by the specific cleavage of the 2'-5' phospho-

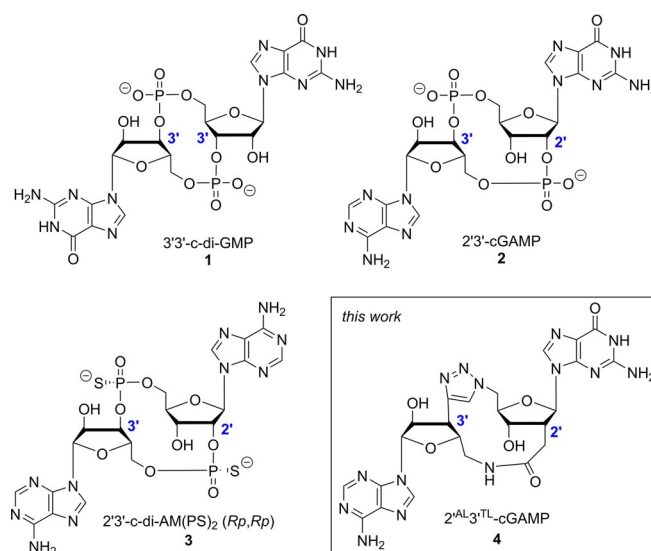


Figure 1. Depiction of the symmetrical microbial c-di-GMP **1**, the unsymmetrical STING activator cGAMP **2**, as well as the bisphosphorothioate analogue **3**, together with the molecule **4** targeted here. AL = amide linked, TL = triazole linked.

diester bond by ENPP1 highlighting the importance of this unusual connection.^[15,16]

There is currently tremendous interest to develop synthetic routes towards analogues of cGAMP **2** as potential agonists or antagonists for cGAS and STING.^[17–19] The bisphosphorothioate cGAMP derivative **3**,^[20,21] for example, is already in clinical trials.^[22,23] Alternative targeting of STING with small molecules is also known.^[24–26] Particularly, compounds which lack the negatively charged phosphodiester linkages are discussed as new immune-regulatory pharmaceuticals.^[27] While such derivatives are available for symmetric 3'-5' dinucleotides,^[28–32] to the best of our knowledge, uncharged cGAMP **2** analogues do not exist.

[a] C. R. Dialer, S. Stazzoni, F. M. Müller, S. Veth, A. Pichler, Dr. H. Okamura, Prof. Dr. T. Carell
Department of Chemistry
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstrasse 5–13, 81377 Munich (Germany)
E-mail: thomas.carell@lmu.de
Homepage: www.carellgroup.de

[b] D. J. Drexler, Dr. G. Witte, Prof. Dr. K.-P. Hopfner
Gene Center and Department of Biochemistry
Ludwig-Maximilians-Universität München
Feodor-Lynen-Strasse 25, 81377 Munich (Germany)

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under:
<https://doi.org/10.1002/chem.201805409>

In this article, we describe the modular synthesis of a neutral cGAMP analogue **4** that features one triazole and one amide linkage. The triazole was generated by a Cu^I catalyzed alkyne-azide click reaction (CuAAC) that was found to be particularly efficient on nucleotides and oligonucleotides.^[33–35]

Results and Discussion

We decided to start our synthetic study by synthesizing the cGAMP analogue **4**, in which the 5'-G-3'-A linkage is replaced by a triazole unit and the 2'-G-5'-A linkage is substituted by an amide bond.

Molecular modeling (Figure 2) showed that the analogue **4** is able to adopt a conformation that is similar to the natural ligand bound to STING.^[11,36]

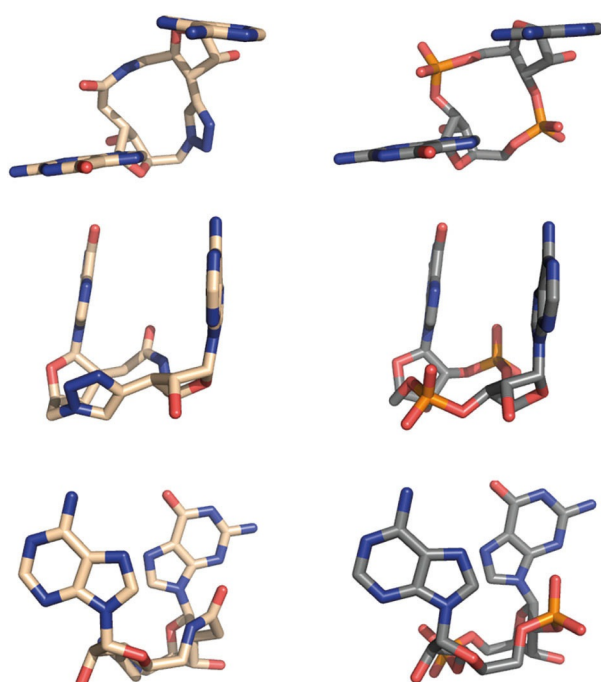


Figure 2. 3D representation showing the potential conformational similarity between compound **4** (left) and natural 2'3'-cGAMP (right, conformation of **2** bound to STING, PDB: 4LOH).

In both cases, the macrocycle is thought to force the bases into a shifted parallel orientation with the imidazole part of the nucleobases pointing towards each other. This requires *anti*-conformations of both glycosidic bonds. The preferred conformation of compound **4** will be governed by aromatic the triazole unit. For the conformation of the amide we assume a *syn*-conformation due to the small ring size.

Analysis of potential synthetic accesses of **4** shows that it can be generated by Cu^I catalyzed azide alkyne reaction plus a preceding or following lactamization. We developed the synthesis based on the A-half **5** and the corresponding G-half **6** as depicted in Figure 3.

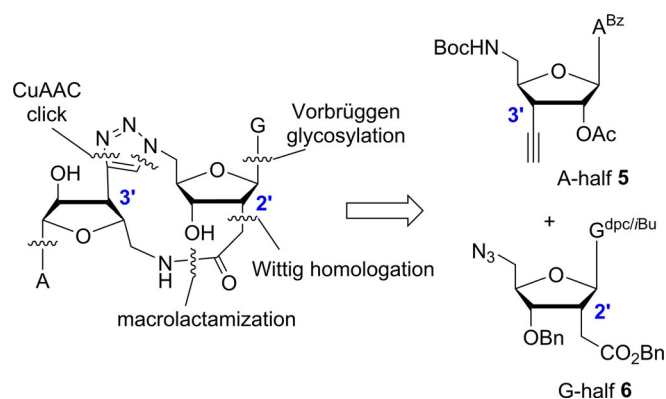
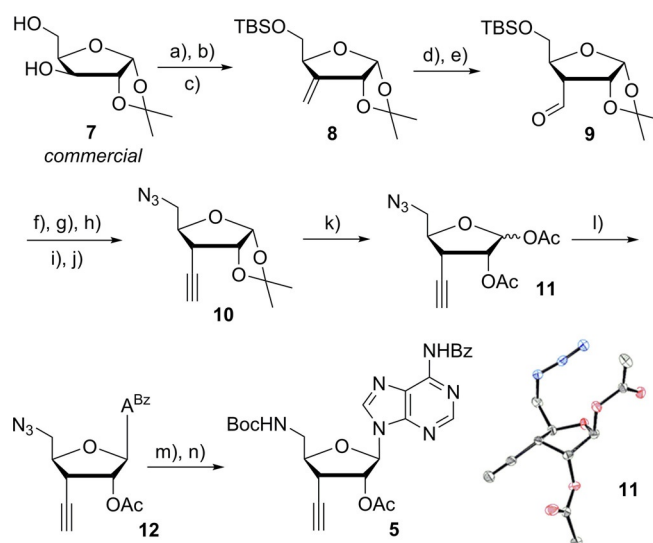


Figure 3. Synthetic strategy towards compound **4**. dpc = diphenylcarbamoyl, *i*Bu = isobutryl.



Scheme 1. Synthesis of the A-half **5** in 14 steps. a) TBSCl, Py, RT, 2 h, 97%; b) (COCl)₂, DMSO, NEt₃, DCM, –60 °C, 3 h; c) CH₃PPh₃Br, BuLi, THF, RT, 6 h, 81% (over two steps); d) BH₃·DMS, THF, RT, 12 h then 30% H₂O₂, 2 N NaOH, RT, 2 h, 76%; e) (COCl)₂, DMSO, NEt₃, DCM, –60 °C, 3 h, 93%; f) CBr₄, PPh₃, DCM, 0 °C, 1 h then RT, 12 h, 85%; g) BuLi, THF, –78 °C, 1.5 h, 83%; h) TBAF, THF, RT, 4 h, 95%; i) TsCl, Py, RT, 18 h, 87%; j) NaN₃, DMF, 80 °C, 3 h, 94%; k) HOAc/Ac₂O, H₂SO₄ (cat.), RT, 5 h, 78%; l) 6-*N*-benzoyladenine, BSA, TMSOTf, DCE, 80 °C, 4 h, 61%; m) PMe₃, H₂O, THF, 40 °C, then RT, 12 h, 66%; n) Boc₂O, NEt₃, DCM, RT, 16 h, 64%. Overall yield starting from **7**: 6%.

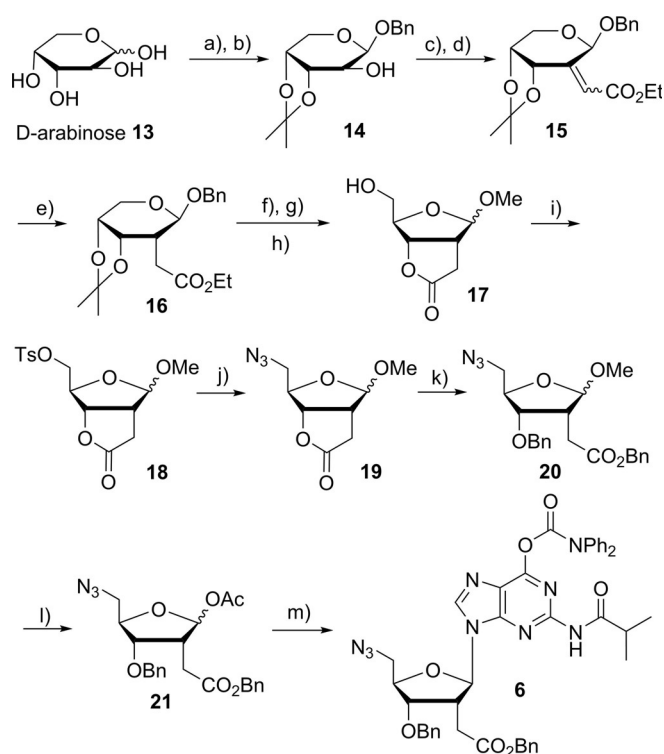
tonide protected xylofuranoside **7** (two steps from D-xylose), which we converted in three steps into the 5-TBS-1,2-acetonide protected 3-methylene xylofuranoside **8**.

After stereoselective hydroboration (BH₃·DMS, dr: 9:1) of **8** and Swern oxidation, we obtained the carbonyl compound **9**, which we subjected to a Corey–Fuchs alkylation (CBr₄, BuLi). TBS deprotection and conversion of the primary hydroxyl group into the azide gave the key intermediate **10**. X-ray analysis of the structure of **10** proved the right configuration of the compound (recrystallisation from isohexanes/ethyl acetate).

Subsequent cleavage of the isopropylidene group and acetyl protection of the hydroxyl groups provided compound **11**, which was the sugar building block for the following glyco-

sylation step. The Vorbrüggen reaction to **12** was found to be most efficient under BSA/TMSOTf conditions with a benzoyl protected A-heterocycle (α/β : 1:12). Finally, we converted the azide via a Staudinger reduction (PMe_3 worked better than PPh_3) into the corresponding amine, which was Boc-protected afterwards to give the A-half **5**.

The desired G-half (Scheme 2) was synthesized starting from D-arabinose (**13**). 1-O-Benzyl and 3,4-acetonide protection yielded alcohol **14**.



Scheme 2. Synthesis of the G-half **6** in 13 steps. a) AcCl , BnOH , 60°C , 5 h, 80%; b) $\text{Me}_2\text{C}(\text{OMe})_2$, Me_2CO , $p\text{-TsOH}$ (cat.), 60°C , 2 h, 84%; c) $(\text{COCl})_2$, DMSO , NEt_3 , DCM , -60°C , 3 h; d) $\text{Ph}_3\text{PCHCO}_2\text{Et}$, DCM , RT , 12 h, 86% (over two steps); e) H_2 , Raney-Ni , EtOH , RT , 20 h, 90%; f) H_2 , Pd/C , EtOH/THF , 36 h, 88%; g) 80% HOAc , RT , 24 h; h) H_2SO_4 (cat.), MeOH , 4°C , 3 d, 72% (over two steps); i) TsCl , Py , RT , 18 h, 76%; j) NaN_3 , DMF , 80°C , 3 h, 75%; k) BnBr , KOH , THF , reflux, 5 h, 91%; l) $\text{HOAc/Ac}_2\text{O}$, H_2SO_4 (cat.), RT , 3 h, 85%; m) 6-O-(diphenylcarbamoyl)-2-N-isobutylguanine ($\text{G}^{\text{dpc}/\text{IBu}}$), BSA , TMSOTf , DCE , 80°C , 2 h, 72%. Overall yield starting from **13**: 10%.

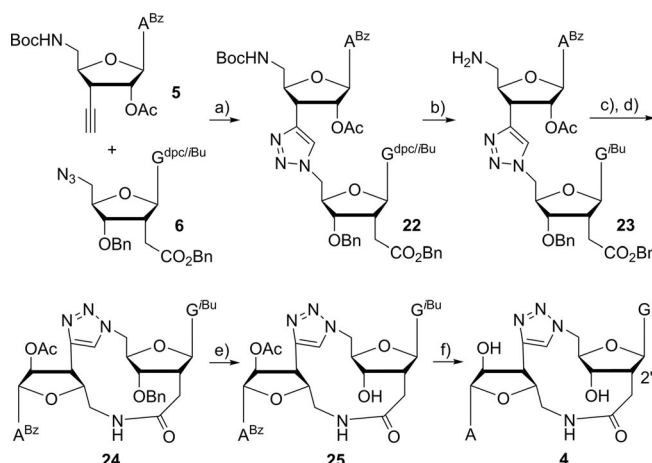
Subsequent Swern oxidation and Wittig homologation provided the intermediate **15** (E/Z : 4:1). Employing the acetonide protective group as a stereoselective directing group, compound **16** was almost exclusively obtained in *R*-configuration via a Raney-Ni-assisted hydrogenation (dr: 20:1).

Under these reduction conditions the 1-O-benzyl group remained unaffected—keeping the sugar in its pyranoside configuration. Removal of the protective groups and treatment with catalytic amounts of acid furnished at 4°C selectively the ribofuranoside **17**. This was followed by an in situ lactonization. The resulting alcohol **17** was tosylated and reacted with NaN_3 to give azide **19**. The absolute configuration of the com-

pounds was again proven with a crystal structure of **18** (Supporting Information).

We subsequently opened the lactone ring to compound **20** via hydroxide-mediated benzyl protection and converted it into its 1-O-acetyl derivative **21**. The glycosylation reaction to the G-half **6** was performed by a so far unreported Vorbrüggen pattern in high β -selectivity (α/β : 1:14) and good yields (79%).

The assembly of nucleoside building blocks A (**5**) and G (**6**) was initiated by a CuAAC reaction. This reaction went smoothly and provided the dinucleotide **22** in fair yield of 80% (Scheme 3). We noticed that click-approaches with the Boc-protected amine compound A gave rise of several side products as monitored by thin-layer chromatography (TLC).



Scheme 3. The assembly towards cyclic dinucleotide **4** in 6 steps. a) CuSO_4 , Na-ascorbate , $\text{THF/tBuOH/H}_2\text{O}$, RT , 24 h, 80%; b) TFA/DCM (1:1), 0°C , 1 h, 81%; c) H_2 , Pd/C , EtOH , 36 h; d) HATU , DIPEA , DMF (1 mm), RT , 24 h, 52% (over two steps); e) BCl_3 , DCM , -40°C , 3 d; f) NH_3 , $\text{H}_2\text{O/MeOH}$, 50°C , 20 h, 48% (over two steps). Overall yield starting from **5** and **6**: 16%.

TFA treatment of dinucleotide **22** resulted in the cleavage of both the Boc and the diphenylcarbamoyl (dpc) group. Besides, this was the last step of the consecutive synthesis where purification could be easily conducted by flash column chromatography (DCM/MeOH , 10:1) due to the increasing polarity of the following compounds. A palladium catalyzed hydrogenation deprotected the benzyl ester by leaving the secondary 3''''-O-benzyl ether intact. Final macrolactamization with HATU furnished the cyclized dinucleotide **24**.

Deprotection of the 3''''-O-benzyl ether under BCl_3/DCM conditions (-40°C) proved to be the best option even though solubility in organic solvents decreased with ongoing removal of protective groups. Final ammonolysis revealed our target molecule **4** in 2% overall yield starting from the G-pathway (19 steps) and 1% starting from the A-pathway (20 steps), respectively. Compounds **24**, **25** and **4** were purified by RP-HPLC and subjected to further NMR-studies.

Conformational Analysis and Conclusion

We performed detailed NOESY experiments in order to determine the conformation preferences of target compound **4** in

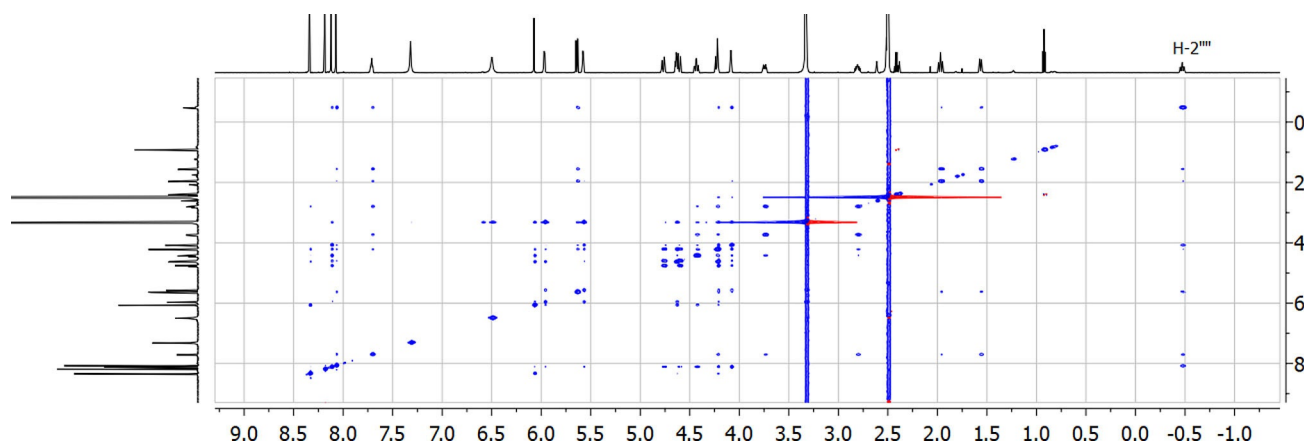


Figure 4. NOESY spectrum of the final compound **4** in $[D_6]DMSO$.

respect to potential STING binding. The spectrum is shown in Figure 4. The most informative NOE contacts together with a depiction of the modelling results of **4** in solution is shown in Figure 5. The NMR data confirm the overall structure with two

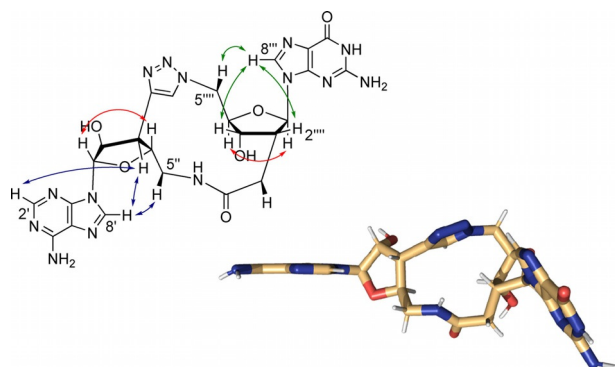


Figure 5. Selected NOE contacts of compound **4** (in $[D_6]DMSO$) and modelling of the preferred conformation based on the NOE data.

β -configured glycosidic bonds both in anti-conformation. Most interesting, however, is the large shielding of proton H-2''', which shifts from $\delta(\text{compound } \mathbf{23}) = 4.12$ ppm to $\delta(\text{compound } \mathbf{4}) = -0.47$ ppm. This dramatic shift indicates that the proton is positioned just on top of the aromatic triazole ring.

According to this low chemical shift, it is assumed that H-2''' points directly to the triazole ring within the cyclized structures of compounds **24**, **25** and **4**. Unraveling of the conformation just based on the NOE data shows that compound **4** likely adopts a more open conformation in solution ($[D_6]DMSO$) compared to cGAMP **2**, with the two heterocycles being not parallel to each other.

Potential binding of compound **4** to STING was tested in vitro by nanoDSF assays and analysis of thermal unfolding of the STING constructs hSTING L139 (human STING AA139-379) and mSTING L138 (mouse STING AA138-378). We used the physiological ligand 2'3'-cGAMP and a ligand with lower affinity, 3'3'-cGAMP, as positive controls. As expected after the conformational analysis of compound **4**, binding to hSTING or

mSTING could not be detected. This result was confirmed with ITC experiments (see supporting information). Based on the more open structure of the here prepared compound **4**, we believe that interaction studies with cGAS or ENPP1 may be more promising. Investigations in this direction are on the way.

In summary, we report the first synthesis of a 2'3'-cGAMP analogue which features uncharged bridges that should provide membrane crossing properties. The synthetic strategy involved first linking of the two nucleotides by a Cu^I catalyzed click reaction followed by a macrolactamization to close the cycle. The synthesis of medium size ring structures is always difficult. We believe that the here described strategy will open the access to a variety of derivatives of **4**. This allows systematic scanning of the conformational space of the two nucleobases relative to each other regarding the binding to the involved proteins STING, cGAS and ENPP1.

Experimental Section

Unless otherwise specified, all reactions were magnetically stirred under an N_2 atmosphere. Reaction vessels were dried under high vacuum at $550^\circ C$ prior to use. Dry solvents and reagents were purchased from commercial suppliers, such as Sigma-Aldrich, Acros Organics, Carbosynth, TCI Europe, ABCR, VWR, stored under septum over molecular sieves and used as received. The reaction progress and fractions during column chromatography were monitored by TLC on silica gel 60-F₂₅₄ plates purchased from Merck and visualized by irradiation with UV-light (254 nm or 366 nm) and *p*-anisaldehyde staining solution (*p*-anisaldehyde (3.7 mL), EtOH (135 mL), conc. H_2SO_4 (5 mL), conc. AcOH (1.5 mL)). Purification was performed using flash column chromatography with silica gel (Merck, particle size 0.063–0.200 mm). The eluents used were determined by TLC. Purification of the crude dinucleotides **24**, **25** and **4** was operated by Waters 2695 reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) using Nucleosil columns (250/4 mm, C18ec, particle size 3 μm for analysis or 250/10 mm, C18ec, 5 μm for purification) from Machery-Nagel with a buffer-free $H_2O/MeCN$ eluent system. Water was purified by a Milli-Q Plus system from Merck Millipore. NMR-spectra were measured on a Bruker Ascend 400 or Bruker ARX 600 at room temperature operating at 400 MHz or 600 MHz for 1H -nuclei and at 101 MHz or 151 MHz for ^{13}C -nuclei. The chemical shift (δ) in the NMR-spectra is

reported in parts per million (ppm) and referenced by the residual solvent signal. Measurements were performed in CDCl₃ and [D₆]DMSO. The spectra were referenced to the residual protons and carbons of the solvent (CHCl₃: $\delta(^1\text{H})=7.26$ ppm, $\delta(^{13}\text{C})=77.16$ ppm; [D₆]DMSO: $\delta(^1\text{H})=2.50$ ppm, $\delta(^{13}\text{C})=39.52$ ppm). Proton-spectra also show the integral intensity, the multiplicity, abbreviated with s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet) and the coupling constant (*J* in Hz). Assignments of the signals were performed using 2D-NMR techniques such as homo-nuclear correlation spectroscopy (COSY), nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY), heteronuclear single quantum coherence (HSQC) and heteronuclear multiple bond coherence (HMBC). All spectra were analyzed with the software MestReNOVA 10.0 from Mestrelab Research, S. L. Atom labelling and nomenclature are not in correspondence with IUPAC. High resolution mass spectra (HRMS) were measured on a Thermo Finnigan MAT 95 (EI) and a Thermo Finnigan LTQ FTICR (ESI). IR-measurements were performed on a PerkinElmer Spectrum BX FT-IR spectrometer with a diamond-ATR (Attenuated Total Reflection) setup. Uncorrected melting points were determined with an automated Stanford Research Systems EZ-Melt apparatus (digital image processing technology). Samples were loaded in open capillary tubes. X-ray crystallography of single crystals was performed on an Oxford XCalibur diffractometer and further analysis by the software Ortep-3.^[37] The structure of the synthesized analogue **4** in Figure 2 was obtained using the geometry optimization tool of the open source software Avogadro and visualized by PyMol.

Nano differential scanning fluorimetry (nanoDSF)

Thermal melting experiments of STING constructs were performed using a Tycho NT.6 instrument (NanoTemper Technologies). In brief, the samples were heated up in a glass capillary and while heating, the internal fluorescence at 330 nm and 350 nm was recorded. Data analysis, data smoothing, and calculation of derivatives was done using the internal evaluation features of the NT.6 instrument. All measurements were repeated to confirm robustness of the assay.

Isothermal titration calorimetry

ITC experiments were performed using a Malvern PEAQ-ITC system with 20 μM protein in ITC-buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl) in the cell. The positive controls of cGAMP ligands (Biolog) were titrated in a concentration of 200 μM into the cell by 19 injections of 2 μL , spaced 150 s apart, at 25 °C. Compound **4** was used in a concentration of 291 μM for titration. The results were analyzed using the MicroCal PEAQ-ITC analysis software provided with the instrument. All titrations were repeated to confirm robustness of the assay.

Cloning, expression and purification

Human STING AA139-379 and mouse STING AA138-378 constructs were cloned according to previous studies.^[38] The plasmids were used to transform *E. coli* Rosetta (DE3) protein expression strain cells (Novagen). The cells were grown in 1 L of Turbo Broth™ media (Molecular Dimensions) supplemented with Kanamycin (50 mg L⁻¹) and Chloramphenicol (34 mg L⁻¹) at 37 °C to an OD₆₀₀ = 1.3 and expression was induced by adding IPTG to a final concentration of 0.2 mM. Purification of the STING constructs has been performed as described previously.^[38]

4-[6'-Benzoylamino-9'-(2''-O-acetyl-5'''-amino-3'',5'''-dideoxy- β -D-ribofuranosyl)-9'-H-purin-3'''-yl]-1-{9'''-[3'''-O-benzyl-2''',5'''-dideoxy-2'''-C-carboxymethyl- β -D-ribofuranosyl]-2'''-N-isobutyrylguanin-5'''-yl}-2''',5'''-lactame-1,2,3-triazole (**24**)

To a stirred solution of dinucleotide **22** (2.12 g, 1.61 mmol, 1.00 equiv.) in dry DCM (40 mL) was added TFA (20 mL) at 0 °C under N₂. The mixture was stirred for 1 h at this temperature and then concentrated in vacuo. The brown residue was purified by flash-column chromatography (silica gel, DCM/MeOH, 100:2 \rightarrow 100:5 \rightarrow 5:1) to give amino compound **23** as a colorless solid (1.33 g, 1.30 mmol, 81%). mp 128 °C (decomp.). *R*_f = 0.39 (DCM/MeOH = 5:1). ESI-HRMS calcd for [C₅₁H₅₂N₁₄O₁₀ + H]⁺: 1021.4064, found: 1021.4038. ESI-HRMS calcd for [C₅₁H₅₂N₁₄O₁₀ - H]⁻: 1019.3918, found: 1019.3918.

To a solution of amino compound **23** (1.08 g, 1.06 mmol, 1.00 equiv.) in EtOH (50 mL) was added Pd/C (10 wt.%, 0.30 g) under nitrogen stream at RT. The reaction vessel was evacuated and flushed with hydrogen three times. The mixture was stirred under hydrogen atmosphere for 36 h and then filtered through celite. The solution was concentrated to dryness under reduced pressure. The residue was used in the next step without further purification. ESI-HRMS calcd for [C₄₄H₄₆N₁₄O₁₀ + H]⁺: 931.3594, found: 931.3594. ESI-HRMS calcd for [C₄₄H₄₆N₁₄O₁₀ - H]⁻: 929.3448, found: 929.3450.

Finally, the title compound was prepared according to a modified procedure of Horne et al.^[45] and Kinzie et al.^[46] To a yellow solution of the hydrogenated compound **23** and HATU (0.60 g, 1.58 mmol, 1.50 equiv.) in dry DMF (1000 mL) was added DIPEA (0.72 mL, 0.54 g, 4.21 mmol, 4.00 equiv.) at RT. The solution turned orange and was stirred at RT for 24 h. After addition of MeOH (5 mL), volatile materials were removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, DCM/MeOH, 100:2 \rightarrow 100:5 \rightarrow 5:1) to yield cyclized compound **24** as a colorless solid (506 mg, 0.55 mmol, 52% over 2 steps). An analytical sample was provided by RP-HPLC. mp 185 °C (decomp.). *R*_f = 0.57 (DCM/MeOH = 5:1). *R*_t = 16.1 min (RP-HPLC, 15% to 80% MeCN gradient elution). IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3220, 1682, 1608, 1454, 1403, 1222, 1049, 797, 708 cm⁻¹. ¹H NMR, COSY, NOESY (600 MHz, [D₆]DMSO): δ = 12.06 (s, 1H, NH), 11.59 (s, 1H, NH), 11.27 (s, 1H, NH), 8.83 (s, 1H, H-2'), 8.68 (s, 1H, H-8'), 8.54 (s, 1H, H-5), 8.35 (s, 1H, H-8'''), 8.08–8.03 (m, 2H, Bz-*o*-CH), 8.06–8.03 (s, 1H, CH₂CONHCH₂), 7.68–7.63 (m, 1H, Bz-*p*-CH), 7.59–7.53 (m, 2H, Bz-*m*-CH), 7.52–7.49 (m, 2H, Bn-*o*-CH), 7.44–7.40 (m, 2H, Bn-*m*-CH), 7.38–7.34 (m, 1H, Bn-*p*-CH), 6.46 (d, ³*J* = 1.1 Hz, 1H, H-1''), 5.92 (dd, ³*J* = 5.9 Hz, ³*J* = 1.1 Hz, 1H, H-2''), 5.66 (d, ³*J* = 10.2 Hz, 1H, H-1'''), 4.85 (dd, ²*J* = 15.0 Hz, ³*J* = 3.3 Hz, 1H, H₅-5'''), 4.80–4.77 (m, 1H, H₆-5'''), 4.80 (d, ²*J* = 10.9 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.76 (dd, ³*J* = 10.6 Hz, ³*J* = 6.0 Hz, 1H, H-3'), 4.68 (d, ²*J* = 10.9 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.68–4.66 (m, 1H, H-4'''), 4.57 (td, ³*J* = 10.5 Hz, ³*J* = 4.1 Hz, 1H, H-4''), 4.15 (d, ³*J* = 3.4 Hz, 1H, H3'''), 3.87–3.81 (m, 1H, H₅-5''), 2.91–2.83 (m, 1H, H₆-5''), 2.67 (hept, ³*J* = 6.9 Hz, 1H, CH(CH₃)₂), 2.11 (s, 3H, OCOCH₃), 2.04 (t, ³*J* = 12.0 Hz, 1H, CH₂CONH), 1.76–1.70 (m, 1H, CH₂CONH), 1.07, (d, ³*J* = 6.9 Hz, 3H, CH(CH₃)₂), 1.06, (d, ³*J* = 6.9 Hz, 3H, CH(CH₃)₂), -0.19–0.26 (m, 1H, H-2''') ppm. ¹³C NMR, HSQC, HMBC (151 MHz, [D₆]DMSO): δ = 180.1 (*i*Bu-CONH), 170.8 (CH₂CONHCH₂), 169.1 (OCOCH₃), 165.7 (N-CO-Ph), 154.8 (C-2''), 151.8 (C-2'), 151.5 (C-4'), 150.7 (C-6'), 149.1 (C-6'''), 148.30 (C-4''), 144.0 (C-8'), 142.8 (C-4), 138.2 (OCH₂Ph-C-1), 137.9 (C-8'''), 133.3 (Bz-C-CO-N), 132.5 (Bz-*p*-CH), 128.53 (Bz-*o*-CH), 128.49 (Bz-*m*-CH), 128.47 (Bn-*m*-CH), 128.3 (Bn-*o*-CH), 127.9 (Bn-*p*-CH), 126.8 (C-5), 126.2 (C-5'), 119.7 (C-5''), 89.3 (C-1'), 83.3 (C-1'''), 81.2 (H-4'), 79.9 (H-3'''), 79.8 (H-4'''), 77.5 (C-2'), 72.0 (OCH₂Ph), 53.0 (C-5'''), 46.9 (C-2'''), 44.5 (C-3'), 42.4 (C-

5''), 34.7 (CH(CH₃)₂), 29.7 (CH₂CONH), 20.7 (OCOCH₃), 18.81 (CH(CH₃)₂), 18.79 (CH(CH₃)₂) ppm. ESI-HRMS calcd for [C₄₄H₄₄N₁₄O₉ + H]⁺: 913.3489, found: 913.3495. ESI-HRMS calcd for [C₄₄H₄₄N₁₄O₉ - H]⁻: 911.3343, found: 911.3348.

4-[6'-Benzoylamino-9'-(2''-O-acetyl-5''-amino-3'',5''-dideoxy-β-D-ribofuranosyl)-9'-H-purin-3''-yl]-1-[9'''-[2''',5'''-dideoxy-2''',C-carboxymethyl-β-D-ribofuranosyl]-2'''-N-isobutyrylguanin-5'''-yl]-2''',5''-lactame-1,2,3-triazole (25)

To a solution of dinucleotide **24** (340 mg, 0.37 mmol, 1.00 equiv.) in dry DCM (300 mL) was added BCl₃ (5.96 mL, 5.96 mmol, 1 M in DCM, 16.0 equiv.) at -40 °C. The mixture was stirred for 3 days at this temperature, quenched by addition of MeOH (5 mL) and extracted with saturated sodium bicarbonate (20 mL) and DCM (4 × 50 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated in vacuo. The compound was used in the next step without further purification. An analytical sample was prepared by RP-HPLC to yield a colorless solid. mp 258 °C (decomp.). R_t = 12.5 min (RP-HPLC, 15% to 80% MeCN gradient elution). IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3234, 1756, 1677, 1613, 1460, 1403, 1220, 1047, 796, 707 cm⁻¹. ¹H NMR, COSY, NOESY (600 MHz, [D₆]DMSO): δ = 12.07 (s, 1H, NH), 11.69 (s, 1H, NH), 11.26 (s, 1H, NH), 8.82 (s, 1H, H-2'), 8.66 (s, 1H, H-8'), 8.43 (s, 1H, H-5), 8.33 (s, 1H, H-8'''), 8.08–8.03 (m, 1H, Bz-o-CH), 7.93–7.87 (m, 1H, CH₂CONHCH₂), 7.68–7.63 (m, 1H, Bz-p-CH), 7.59–7.53 (m, 2H, Bz-m-CH), 6.42 (d, ³J = 1.1 Hz, 1H, H-1'), 5.88 (dd, ³J = 5.9 Hz, ³J = 1.1 Hz, 1H, H-2''), 5.76 (d, J = 10.2 Hz, 1H, H-1'''), 5.68 (d, J = 3.4 Hz, 1H, OH-3'''), 4.78 (dd, ²J = 15.0 Hz, ³J = 3.3 Hz, 1H, H_a-5'''), 4.71 (dd, ³J = 10.6 Hz, ³J = 6.0 Hz, 1H, H-3'), 4.68 (dd, ²J = 15.0 Hz, ³J = 1.8 Hz, 1H, H_b-5'''), 4.50 (td, ³J = 10.4 Hz, ³J = 3.9 Hz, 1H, H-4'), 4.32–4.29 (m, 1H, H-4'''), 4.17–4.13 (m, 1H, H-3'''), 3.82–3.74 (m, 1H, H_a-5'), 2.89–2.79 (m, 1H, H_b-5'), 2.73 (hept, ³J = 6.8 Hz, 1H, CH(CH₃)₂), 2.09 (s, 3H, OCOCH₃), 2.02 (t, ³J = 12.0 Hz, 1H, CH₂CONH), 1.67–1.60 (m, 1H, CH₂CONH), 1.11, (d, ³J = 6.8 Hz, 3H, CH(CH₃)₂), 1.10, (d, ³J = 6.8 Hz, 3H, CH(CH₃)₂), -0.39–0.49 (m, 1H, H-2''') ppm. ¹³C NMR, HSQC, HMBC (151 MHz, [D₆]DMSO): δ = 180.1 (iBu-CONH), 171.0 (CH₂CONHCH₂), 169.2 (OCOCH₃), 165.7 (N-CO-Ph), 154.8 (C-2'''), 151.8 (C-2'), 151.5 (C-4'), 150.7 (C-6'), 149.1 (C-6''), 148.30 (C-4'''), 144.0 (C-8'), 142.6 (C-4), 138.2 (C-8'''), 133.3 (Bz-CO-N), 132.5 (Bz-p-CH), 128.52 (Bz-o-CH), 128.49 (Bz-m-CH), 126.6 (C-5), 126.2 (C-5'), 119.7 (C-5''), 89.3 (C-1'), 83.2 (C-1'''), 83.0 (C-4'''), 81.0 (C-4'), 77.4 (C-2''), 70.6 (C-3'''), 52.5 (C-5'''), 47.1 (C-2'''), 44.5 (C-3'), 42.5 (C-5'), 34.8 (CH(CH₃)₂), 29.2 (CH₂CONH), 20.6 (OCOCH₃), 18.85 (CH(CH₃)₂), 18.83 (CH(CH₃)₂) ppm. ESI-HRMS calcd for [C₃₇H₃₈N₁₄O₉ + H]⁺: 823.3019, found: 823.3015. ESI-HRMS calcd for [C₃₇H₃₈N₁₄O₉ - H]⁻: 821.2873, found: 821.2873.

4-[6'-Amino-9'-(5''-amino-3'',5''-dideoxy-β-D-ribofuranosyl)-9'-H-purin-3''-yl]-1-[9'''-[2''',5'''-dideoxy-2''',C-carboxymethyl-β-D-ribofuranosyl]-guanin-5'''-yl]-2''',5''-lactame-1,2,3-triazole (4)

The crude compound **25** was dissolved in MeOH (15 mL) and aqueous ammonia (25%, 15 mL) in a sealed vessel at RT. The mixture was stirred at 50 °C for 20 h. Volatile components were removed under reduced pressure. The residue was purified by preparative RP-HPLC to provide the final compound **4** as a colorless solid (109 mg, 0.18 mmol, 48% over 2 steps). mp 270 °C (decomp.). R_t = 7.8 min (RP-HPLC, 15% to 80% MeCN gradient elution). IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3338, 1639, 1599, 1477, 1419, 1209, 1089, 1047, 1005, 730 cm⁻¹. ¹H NMR, COSY, NOESY (600 MHz, [D₆]DMSO): δ = 10.60 (s, 1H, Guanine-NH), 8.34 (s, 1H, H-8'), 8.19 (s, 1H, H-2'), 8.12 (s, 1H,

H-5), 8.07 (s, 1H, H-8''), 7.73–7.69 (m, 1H, CH₂CONHCH₂), 7.32 (s, 2H, A-NH₂), 6.50 (s, 2H, G-NH₂), 6.07 (d, ³J = 1.1 Hz, 1H, H-1''), 5.97 (d, ³J = 5.1 Hz, 1H, H-2'), 5.64 (d, J = 10.3 Hz, 1H, H-1'''), 5.58 (d, J = 3.6 Hz, 1H, OH-3'''), 4.77 (dd, ²J = 14.9 Hz, ³J = 3.1 Hz, 1H, H_a-5'''), 4.65–4.62 (m, 1H, OH-2''), 4.61 (dd, ²J = 14.9 Hz, ³J = 1.5 Hz, 1H, H_b-5'''), 4.43 (td, ³J = 10.5 Hz, ³J = 4.1 Hz, 1H, H-4'), 4.23–4.21 (m, 1H, H-4'''), 4.23 (dd, ³J = 10.6 Hz, ³J = 5.6 Hz, 1H, H-3'), 4.10–4.07 (m, 1H, H-3'''), 3.77–3.71 (m, 1H, H_a-5''), 2.84–2.77 (m, 1H, H_b-5''), 1.97 (m, 1H, CH₂CONH), 1.56 (dd, ²J = 12.0 Hz, ³J = 2.2 Hz, 1H, CH₂CONH), -0.44–0.41 (m, 1H, H-2''') ppm. ¹³C NMR, HSQC, HMBC (151 MHz, [D₆]DMSO): δ = 170.9 (CH₂CONHCH₂), 156.8 (C-2'''), 156.2 (C-6'), 153.8 (C-6'''), 152.6 (C-2'), 151.7 (C-4'''), 148.7 (C-4'), 143.7 (C-4), 139.81 (C-8'), 136.0 (C-8'''), 126.8 (C-5), 119.5 (C-5'), 116.1 (C-5''), 91.9 (C-1'), 83.7 (C-4'''), 82.7 (C-1'''), 80.8 (C-4'), 75.9 (C-2'), 70.6 (C-3'''), 52.2 (C-5'''), 46.7 (C-2'''), 45.9 (C-3'), 42.7 (C-5'), 29.3 (CH₂CONH) ppm. ESI-HRMS calcd for [C₂₄H₂₆N₁₄O₆ + H]⁺: 607.2233, found: 607.2231. ESI-HRMS calcd for [C₂₄H₂₆N₁₄O₆ - H]⁻: 605.2087, found: 605.2090.

Acknowledgements

We thank Milda Nainytė, Dr. Tynchtyk Amatov and Dr. Markus Müller for scientific discussions, Dr. David Stephenson for NMR spectroscopy, Dr. Peter Mayer for X-ray analysis and Dr. Werner Spahl for high-resolution mass spectrometry. We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for financial support via the programs SFB1032 (TP-A5), SFB749 (TP-A4) and SPP-1784. Additional funding from the Excellence Cluster EXC117 CiPS^M is acknowledged. This project has received additional funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (grant agreement n° EPIr 741912).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: cGAMP analogue • click chemistry • cyclophane • macrolactamization • STING

- [1] O. Danilchanka, J. J. Mekalanos, *Cell* **2013**, *154*, 962–970.
- [2] U. Römling, M. Gomelsky, M. Y. Galperin, *Mol. Microbiol.* **2005**, *57*, 629–639.
- [3] M. Gomelsky, *Mol. Microbiol.* **2011**, *79*, 562–565.
- [4] R. Hengge, *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 263.
- [5] C. Shu, G. Yi, T. Watts, C. C. Kao, P. Li, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 722.
- [6] A. Ablasser, M. Goldeck, T. Cavlar, T. Deimling, G. Witte, I. Röhl, K.-P. Hopfner, J. Ludwig, V. Hornung, *Nature* **2013**, *498*, 380.
- [7] J. Wu, L. Sun, X. Chen, F. Du, H. Shi, C. Chen, Z. J. Chen, *Science* **2013**, *339*, 826–830.
- [8] P. Gao, M. Ascano, Y. Wu, W. Barchet, B. L. Gaffney, L. Barbara, T. Zillinger, Serganov, A. Artem, Y. Liu, Jones, A. Roger, G. Hartmann, T. Tuschl, Patel, J. Dinshaw, *Cell* **2013**, *153*, 1094–1107.
- [9] L. Sun, J. Wu, F. Du, X. Chen, Z. J. Chen, *Science* **2013**, *339*, 786–791.
- [10] Q. Chen, L. Sun, Z. J. Chen, *Nat. Immunol.* **2016**, *17*, 1142.
- [11] X. Zhang, H. Shi, J. Wu, X. Zhang, L. Sun, C. Chen, Z. J. Chen, *Mol. Cell* **2013**, *51*, 226–235.
- [12] K. Kato, H. Omura, R. Ishitani, O. Nureki, *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 541–566.
- [13] C. Shu, X. Li, P. Li, *Cytokine Growth Factor Rev.* **2014**, *25*, 641–648.
- [14] X. Cai, Y.-H. Chiu, Z. J. Chen, *Mol. Cell* **2014**, *54*, 289–296.

- [15] L. Li, Q. Yin, P. Kuss, Z. Maliga, J. L. Millán, H. Wu, T. J. Mitchison, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 1043.
- [16] K. Kato, H. Nishimasu, D. Oikawa, S. Hirano, H. Hirano, G. Kasuya, R. Ishitani, F. Tokunaga, O. Nureki, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4424.
- [17] C. Opoku-Temeng, J. Zhou, Y. Zheng, J. Su, H. O. Sintim, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 9327–9342.
- [18] F. Schwede, H.-G. Genieser, A. Rentsch in *Non-canonical Cyclic Nucleotides. Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 238 (Ed.: R. Seifert), Springer, Cham, **2017**, pp. 307–337.
- [19] P. Clivio, S. Coantic-Castex, D. Guillaume, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 7354–7401.
- [20] K. W. Knouse, J. N. deGruyter, M. A. Schmidt, B. Zheng, J. C. Vantourout, C. Kingston, S. E. Mercer, I. M. McDonald, R. E. Olson, Y. Zhu, C. Hang, J. Zhu, C. Yuan, Q. Wang, P. Park, M. D. Eastgate, P. S. Baran, *Science* **2018**, *361*, 1234–1238.
- [21] T. Lioux, M.-A. Mauny, A. Lamoureux, N. Bascoul, M. Hays, F. Vernejoul, A.-S. Baudru, C. Boularan, J. Lopes-Vicente, G. Qushair, G. Tiraby, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10253–10267.
- [22] J. Fu, D. B. Kanne, M. Leong, L. H. Glickman, S. M. McWhirter, E. Lemmens, K. Mechette, J. J. Leong, P. Lauer, W. Liu, K. E. Sivick, Q. Zeng, K. C. Soares, L. Zheng, D. A. Portnoy, J. J. Woodward, D. M. Pardoll, T. W. Dubensky, Y. Kim, *Science Transl. Med.* **2015**, *7*, 283ra252.
- [23] L. Corrales, S. M. McWhirter, T. W. Dubensky Jr., T. F. Gajewski, *J. Clin. Invest.* **2016**, *126*, 2404–2411.
- [24] S. M. Haag, M. F. Gulen, L. Reymond, A. Gibelin, L. Abrami, A. Decout, M. Heymann, F. G. van der Goot, G. Turcatti, R. Behrendt, A. Ablasser, *Nature* **2018**, *559*, 269–273.
- [25] S. Khair, M. Lucas-Hourani, S. Nisole, N. Smith, O. Helynck, M. Bourguine, C. Ruffié, J.-P. Herbeuval, H. Munier-Lehmann, F. Tangy, P.-O. Vidalain, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2561.
- [26] A. D. F. Adli, R. Jahanban-Esfahlan, K. Seidi, S. Samandari-Rad, N. Zarghami, *Chem. Biol. Drug Des.* **2018**, *91*, 996–1006.
- [27] S. Farkona, E. P. Diamandis, I. M. Blasutig, *BMC Med.* **2016**, *14*, 73.
- [28] T. Fujino, K. Okada, H. Isobe, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 2659–2661.
- [29] C. Pal, T. K. A. Chakraborty, *Asian J. Org. Chem.* **2017**, *6*, 1421–1427.
- [30] B. L. Gaffney, R. A. Jones, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 158–161.
- [31] T. Kline, S. R. Jackson, W. Deng, C. L. M. J. Verlinde, S. I. Miller, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2008**, *27*, 1282–1300.
- [32] S. Fernicola, I. Torquati, A. Paiardini, G. Giardina, G. Rampioni, M. Messina, L. Leoni, F. Del Bello, R. Petrelli, S. Rinaldo, L. Cappellacci, F. Cutruzzola, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8269–8284.
- [33] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639–3642.
- [34] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1388–1405.
- [35] A. H. El-Sagheer, A. P. Sanzone, R. Gao, A. Tavassoli, T. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 11338–11343.
- [36] P. Gao, M. Ascano, T. Zillinger, W. Wang, P. Dai, A. A. Serganov, B. L. Gaffney, S. Shuman, R. A. Jones, L. Deng, G. Hartmann, W. Barchet, T. Tuschl, D. J. Patel, *Cell* **2013**, *154*, 748–762.
- [37] L. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* **2012**, *45*, 849–854.
- [38] T. Cavlar, T. Deimling, A. Ablasser, K. P. Hopfner, V. Hornung, *EMBO J.* **2013**, *32*, 1440–1450.
- [39] V. V. Betkekar, S. Panda, K. P. Kaliappan, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 198–201.
- [40] N.-S. Li, J. Lu, J. A. Piccirilli, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3009–3012.
- [41] M. J. Webber, S. A. Warren, D. M. Grainger, M. Weston, S. Clark, S. J. Woodhead, L. Powell, S. Stokes, A. Alanine, J. P. Stonehouse, C. S. Frampton, A. J. P. White, A. C. Spivey, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2514–2533.
- [42] T. F. Jenny, K. C. Schneider, S. A. Benner, *Nucleosides Nucleotides* **1992**, *11*, 1257–1261.
- [43] M. J. Robins, R. Zou, Z. Guo, S. F. Wnuk, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9207–9212.
- [44] K. S. Singh, K. V. Sharma, K. Bohra, E. C. Olsen, K. A. Prasad, *Curr. Org. Synth.* **2014**, *11*, 757–766.
- [45] W. S. Horne, C. A. Olsen, J. M. Beierle, A. Montero, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4718–4724; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4812–4818.
- [46] C. R. Kinzie, A. D. Steele, S. M. Pasciolla, W. M. Wuest, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 4966–4968.

Manuscript received: October 29, 2018

Accepted manuscript online: December 10, 2018

Version of record online: January 17, 2019

4.2.2. Inhibition von cGAS durch 2'^{AL}3'^{TL}-cGAMP

Das amid- und triazolverknüpfte cGAMP-Analogon 2'^{AL}3'^{TL}-cGAMP (**71**) zeigte bei *in vitro* Tests keine Bindung an STING, was mittels *differential scanning fluorimetry* (DSF) und *isothermal titration calorimetry* (ITC) bestimmt werden konnte.^[171] In weiterführenden Experimenten wurde die Affinität zu cGAS untersucht. Während der angeborenen Immunantwort der Zelle synthetisiert diese Nukleotidyltransferase den hier untersuchten Immunotransmitter 2'3'-cGAMP (siehe Kapitel 1.1). Eine Inhibition dieses Prozesses könnte unter anderem bei Autoimmunerkrankungen interessant sein, bei denen ein Absenken der cGAS-Aktivität von Interesse ist (z.B. Aicardi-Goutières-Syndrom, siehe Kapitel 1.3).

DSF- und ITC-Messungen für die Bindungsaffinität von cGAMP mit cGAS sind deutlich komplexer als mit STING. Denn hier muss berücksichtigt werden, dass die Affinität von cGAS von DNA unterschiedlicher Länge abhängt. Deshalb wurde die mögliche *in vitro* Inhibition von cGAS durch 2'^{AL}3'^{TL}-cGAMP (**71**) provisorisch über einen Verdrängungsassay erforscht (in LMU-Kooperation mit Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner, Dr. David Drexler und Sebastian Michalski).

In einem ersten Versuchsansatz wurden 0.5 mM ATP (**67**) und 0.5 mM GTP (**122**) mit 1 μ M humane cGAS und 200 ng DNA bei 35 °C für 1.5 h inkubiert. Dasselbe Experiment wurde unter Zugabe von 145 μ M 2'^{AL}3'^{TL}-cGAMP (**71**) wiederholt (Abbildung 42).

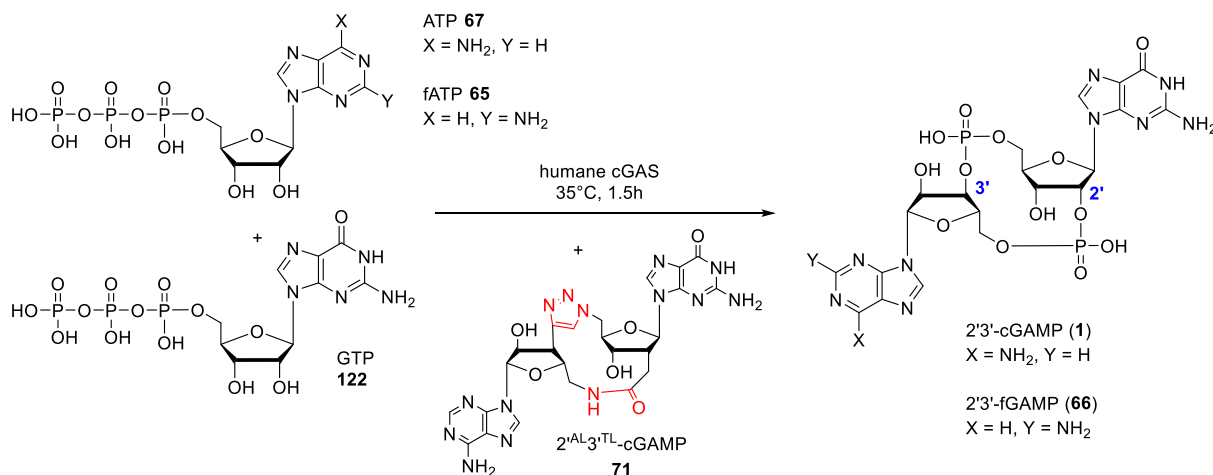


Abbildung 42: Die klassische cGAS-Reaktion mit und ohne Inhibitor **71**.

Die jeweiligen Reaktionsprodukte wurden mittels Ionenaustauschchromatographie aufgetrennt und verglichen. Die Ausbeute von 2'3'-cGAMP (**1**) nahm demzufolge von 59 % (ohne **71**) auf 11 % (mit **71**) ab (Abbildung 43). Das ergab die Analyse der Integrale der unterschiedlichen Komponenten.

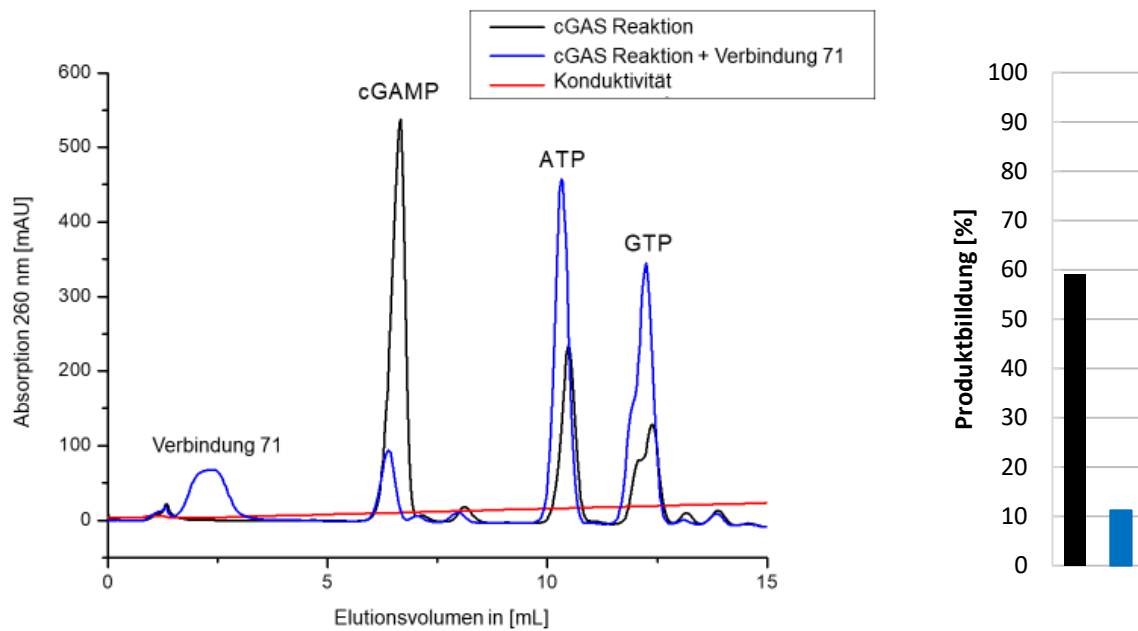


Abbildung 43: Detektion der humanen cGAS-Reaktionsprodukte durch Ionenaustauschchromatographie. Schwarze Kurve: ohne Verbindung 71. Blaue Kurve: mit Verbindung 71. Das Experiment wurde von Dr. David Drexler durchgeführt.

In einem Kontrollexperiment wurde zudem mittels DSF überprüft, dass Verbindung **75** keinen negativen Effekt auf die Stabilität von humaner cGAS hatte. Ohne Zugabe von DNA konnte keine signifikante Schmelzpunktverschiebung von reiner cGAS ($T = 59.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) und cGAS + Verbindung **71** ($T = 60.9\text{ }^{\circ}\text{C}$) gemessen werden (Abbildung 44). Daher kann angenommen werden, dass cGAS durch die Anwesenheit von **71** nicht an Stabilität verliert.

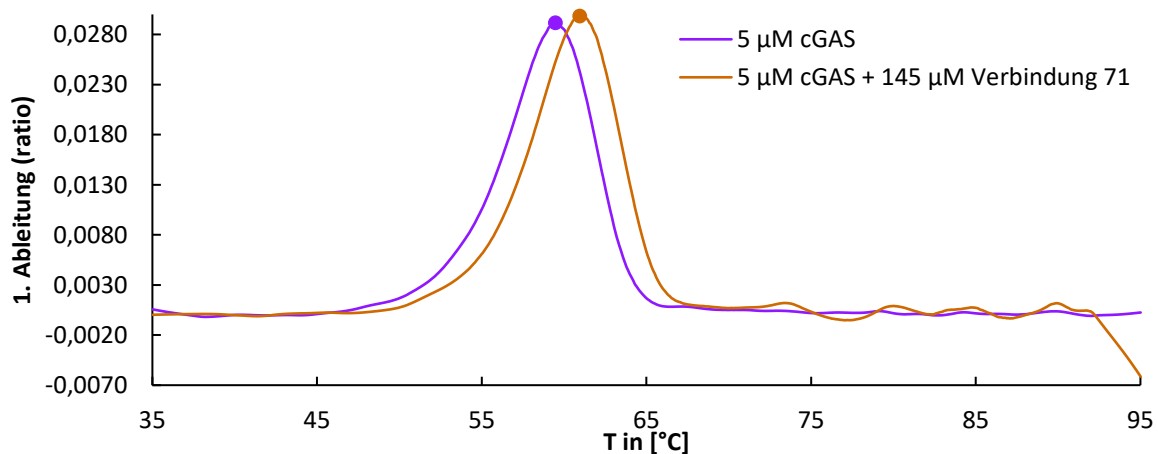


Abbildung 44: Differential Scanning Fluorimetry (DSF) Experiment mit 5 μM humaner cGAS + 145 μM Verbindung 71. Es wird die Schmelzpunktverschiebung (ΔT) des cGAS-Ligand-Addukts gemessen im Vergleich zu cGAS ohne Ligand. Die Messung wurde von Dr. David Drexler durchgeführt.

Im Verbund mit DNA zeigte sich erwartungsgemäß ein höherer Schmelzpunkt für cGAS ($T = 81.4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Auch für die Liganden 2'3'-cGAMP ($T = 83.3\text{ }^{\circ}\text{C}$) und Verbindung **71** ($T = 84.1\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurden höhere Werte detektiert. Die Schmelzpunktverschiebung für cGAS + DNA + **71** ist zwar am höchsten, lässt aber noch wenig Rückschlüsse über die Stärke der Protein-Ligand-Bindung zu (Abbildung 45).

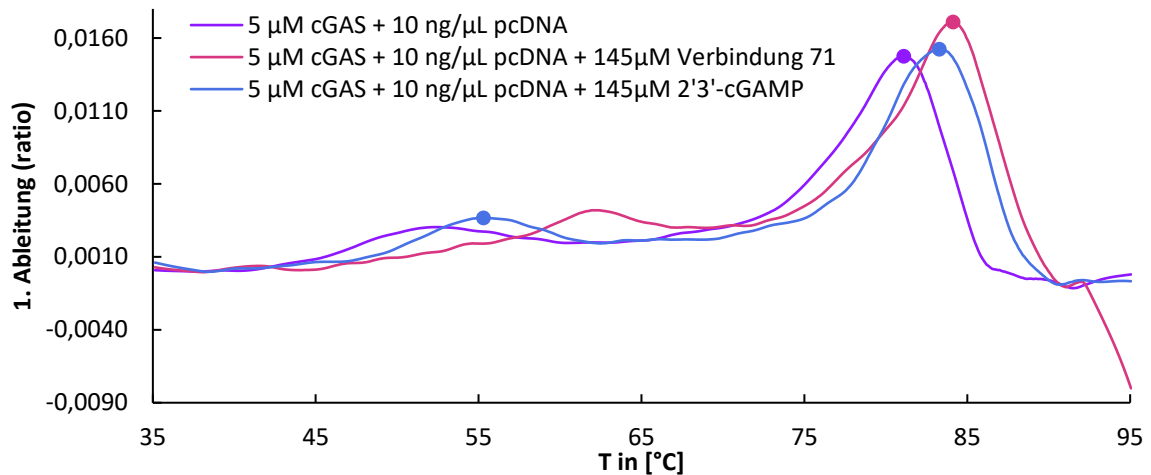


Abbildung 45: Differential Scanning Fluorimetry (DSF) Experiment mit 5 µM humaner cGAS + 10 ng/µL pcDNA + 145 µM Verbindung 71. Es wird die Schmelzpunktverschiebung (ΔT) des cGAS-DNA-Ligand-Addukts gemessen im Vergleich zu cGAS + DNA ohne Ligand. Die Messung wurde von Dr. David Drexler durchgeführt

Um den Zusammenhang zwischen cGAS-Aktivität und zugegebener $2'^{AL}3'^{TL}$ -cGAMP-Konzentration genauer zu überprüfen, wurde nach Vorbild von Andreeva et al.^[154] ein Fluoreszenz Assay mit 2-Aminopurin modifiziertem ATP durchgeführt (**65**, fATP, siehe Kapitel 1.7). Die Abnahme der Fluoreszenzintensität infolge der Zyklisierung zu $2'3'$ -fGAMP (**66**) ist ein Maß für die cGAS-Aktivität. Bei Vorhandensein eines cGAS-Inhibitors würde die natürliche Fluoreszenzabnahme schwächer werden.

Das *in vitro* Experiment wurde mit verschiedenen cGAS- und Inhibitorkonzentrationen unter folgenden Bedingungen durchgeführt: humane cGAS (0 – 1.6 µM) + 0.5 mM fATP + 0.5 mM GTP + 13 ng DNA + $2'^{AL}3'^{TL}$ -cGAMP (**71**), 35 °C, 1.5 h (Abbildung 46). Eine Inhibition wurde erst ab einer Konzentration von 145 µM von **71** deutlich. Geringere Konzentrationen hatten keinen Effekt auf cGAS. Vermutlich lässt sich dieser Befund auf die schwache Bindungsaffinität von Verbindung **71** mit cGAS zurückführen. Die Inhibitorkonzentration ist mit 145 µM insgesamt viel zu hoch, um eine biologische Anwendung zu finden. Wünschenswert wäre eine nanomolare Bindungsaffinität.

cGAS Inhibitor Effekt

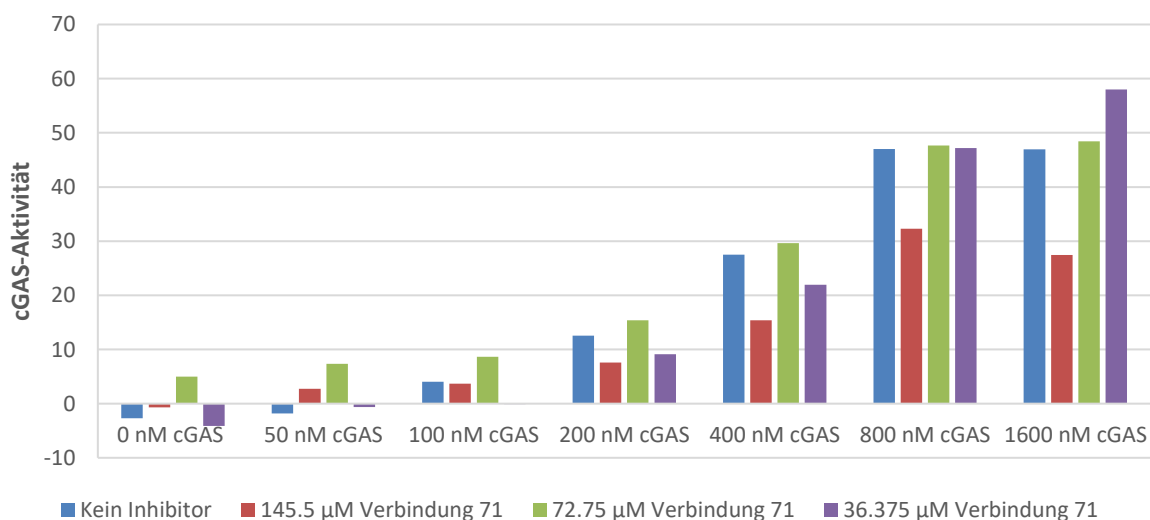


Abbildung 46: Fluoreszenz Assay der humanen cGAS-Reaktion mit und ohne $2'^{AL}3'^{TL}$ -cGAMP (**71**). Das Experiment wurde von Sebastian Michalski durchgeführt.

4.2.3. $2'^{AL}3'^{TL}$ -cGAMP-Stimulation in BLaER1 Monocyten

Die potenziellen regulatorischen Eigenschaften von $2'^{AL}3'^{TL}$ -cGAMP (**71**) wurden ebenfalls in modellhaften Immunzellen untersucht. Dafür eignen sich transdifferenzierte BLaER1 Monocyten^[172], die standardmäßig von Prof. Dr. Veit Hornung und Wilhelm Greulich (beide LMU) zur Analyse der angeborenen Immunantwort verwendet werden.^[173] Die Aktivierung der NF- κ B Signalkaskade durch beispielsweise STING oder Toll-like Rezeptoren (TLR) führt zur Expression von IP-10 Cytokinen. Diese Proteine sind Anzeichen einer Entzündungsreaktion und können selektiv über einen ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) detektiert werden (Abbildung 47). Die Ausschüttung von IP-10 ist ein Maß der Immunantwort (für eine ausführliche Beschreibung der Zellkultur siehe Greulich et al.^[174]).



Abbildung 47: Messung der Immunantwort von externen Stimulanzien durch die Expression von IP-10 Cytokinen in BLaER1 Monocyten (einer humanen B-Zell Precursor Leukämie Zelllinie).

Die BLaER1 Zellen wurden von Wilhelm Greulich fünf bis sechs Tage nach der Transdifferenzierung mit drei unterschiedlichen Konzentrationen von $2'^{AL}3'^{TL}$ -cGAMP (**71**) behandelt. Außerdem wurden Kontrollstudien mit dem Immunmodulator Resiquimod^[175] (**123**, R848, bekannter Agonist für TLR7 und TLR8), Lipopolysaccharid^[176] (LPS, Bestandteil der Bakterienmembran und Agonist für TLR4) und HT DNA (*human tissue DNA*, transfiziert mit Lipofectamin 2000, cGAS-Agonist) durchgeführt. Die Stimulationen wurden bei 37°C über 8h vorgenommen (Abbildung 48).

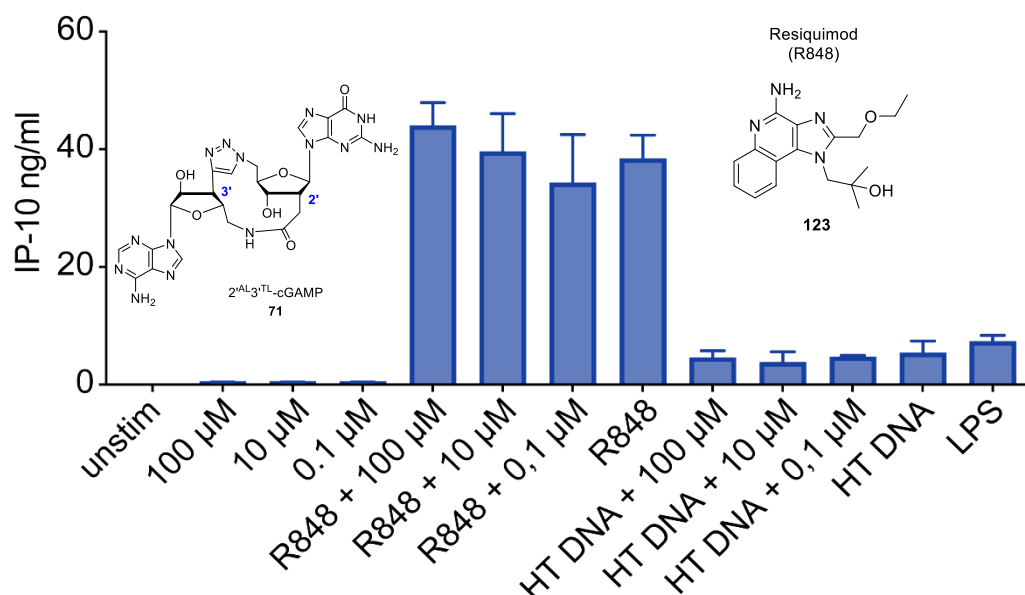


Abbildung 48: Stimulationen von BLaER1 Zellen und Messung der IP-10 Ausschüttung über ELISA. unstim = unstimuliert. Drei Konzentrationen für $2'^{AL}3'^{TL}$ -cGAMP (**71**): 0.1 μ M, 10 μ M und 100 μ M. Die Konzentration der IP-10 stimulierenden Substanzen betrug für R848 1 mg/mL, LPS 200 ng/mL und HT DNA 200ng/well. Das Experiment wurde von Wilhelm Greulich durchgeführt.

Die *in cellulo* Tests zeigten keine signifikante Aktivität von $2'^{AL}3'^{TL}$ -cGAMP (**71**), während die Kontrollexperimente positiv waren.

4.3. 2'3'-TorGAMP: Ein fluoreszierendes 2'3'-cGAMP-Analogon

4.3.1. Synthese von 2'3'-TorGAMP und 3'3'-TorGAMP

Für die chemische Synthese von fluoreszentem 2'3'-cGAMP wären unter Berücksichtigung der Yitzhak Tor Chemie grundsätzlich vier unterschiedliche Analoga denkbar (Abbildung 49): **69**, **124**, **125** und **126**. Nukleobasen, die an der 7-Position einen CH-Gruppe aufweisen, verfügen im Vergleich zu einem N-Atom über bessere Fluoreszenzeigenschaften. Dagegen nimmt die Biokompatibilität von 7-CH modifizierten cGAMP-Analoga ab, da mögliche STING-Interaktionen über Wasserstoffbrückenbindungen unterbunden werden. Zwei interessante Studien von Rovira et al.^[177] und Feldmann et al.^[178] berichten über emittierende synthetische Cofaktoren (NAD⁺) und beleuchten die unterschiedlichen Eigenschaften dieser thiophen- und thiazolbasierten Nukleobasen näher.

Für diese Arbeit war die ausreichende Verfügbarkeit von chemischen Startmaterialien von großer Bedeutung, da die vollständigen Synthesen der Zielverbindungen mehr als 15 Schritte beinhalteten. Unter dieser Voraussetzung war nur das cGAMP-Analogon **69** mit einer G-Substitution ein sinnvolles Target, da deren Vorläuferverbindungen im Gramm-Maßstab gewonnen werden konnten. Für die Thiophen-Adeninbase^[150] und Thiazol-Derivate^[151] waren in der Literatur zu geringe Ausbeuten und Reaktionsskizzen beschrieben.

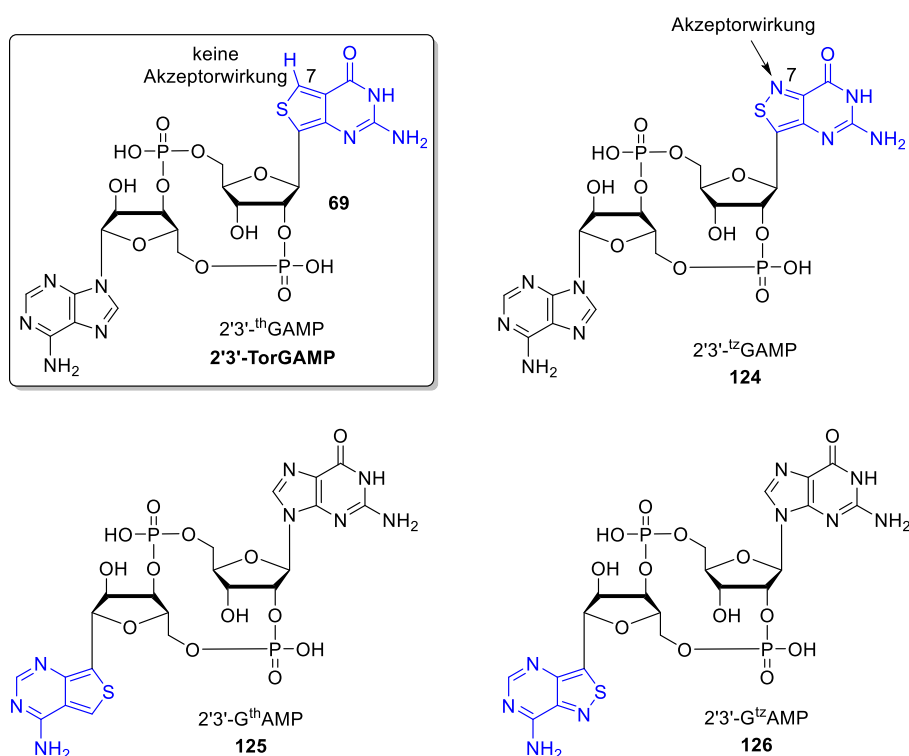


Abbildung 49: Mögliche fluoreszierende 2'3'-cGAMP-Analoga auf der Grundlage von Yitzhak Tors fluoreszenten Nukleobasen. th = Thiophen-Analogon, tz = Thiazol-Analogon.

Die Synthesen wurden in Zusammenarbeit mit Simon Veth durchgeführt. Das DMTr-geschützte Tor-Nukleosid **127** wurde nach Shin et al.^[150] im 8 Gramm-Maßstab synthetisiert (Abbildung 50). Molekül **127** wurde TBS-geschützt und als Isomerengemisch von 3'-OTBS (**128**) und 2'-OTBS (**129**) gewonnen. Die beiden Verbindungen konnten für analytische Zwecke über RP-HPLC (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*) aufgereinigt und charakterisiert werden. Ähnlich wurde mit den

nachfolgenden Verbindungen verfahren. Ansonsten wurde das Gemisch aus praktischen Gründen bis zum letzten Syntheseschritt ungetrennt verwendet.

Nach einer modifizierten Vorschrift von Ching et al.^[179] wurden die Nukleoside **128** und **129** unter DMTr-Entschützung in die korrespondierenden Allylphosphatester **86** und **131** umgewandelt. Die freie 5'-OH Gruppe wurde anschließend mit dem kommerziellen A-Phosphoramidit **85** gekoppelt. Es wurde ein Diastereomergemisch von linearem 2'3'-Dinukleotid (**132**) und 3'3'-Dinukleotid (**133**) erhalten. Bis hierhin konnten die Diastereomere gut über Säulenchromatographie und anschließende RP-HPLC getrennt werden, um die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisieren zu können.

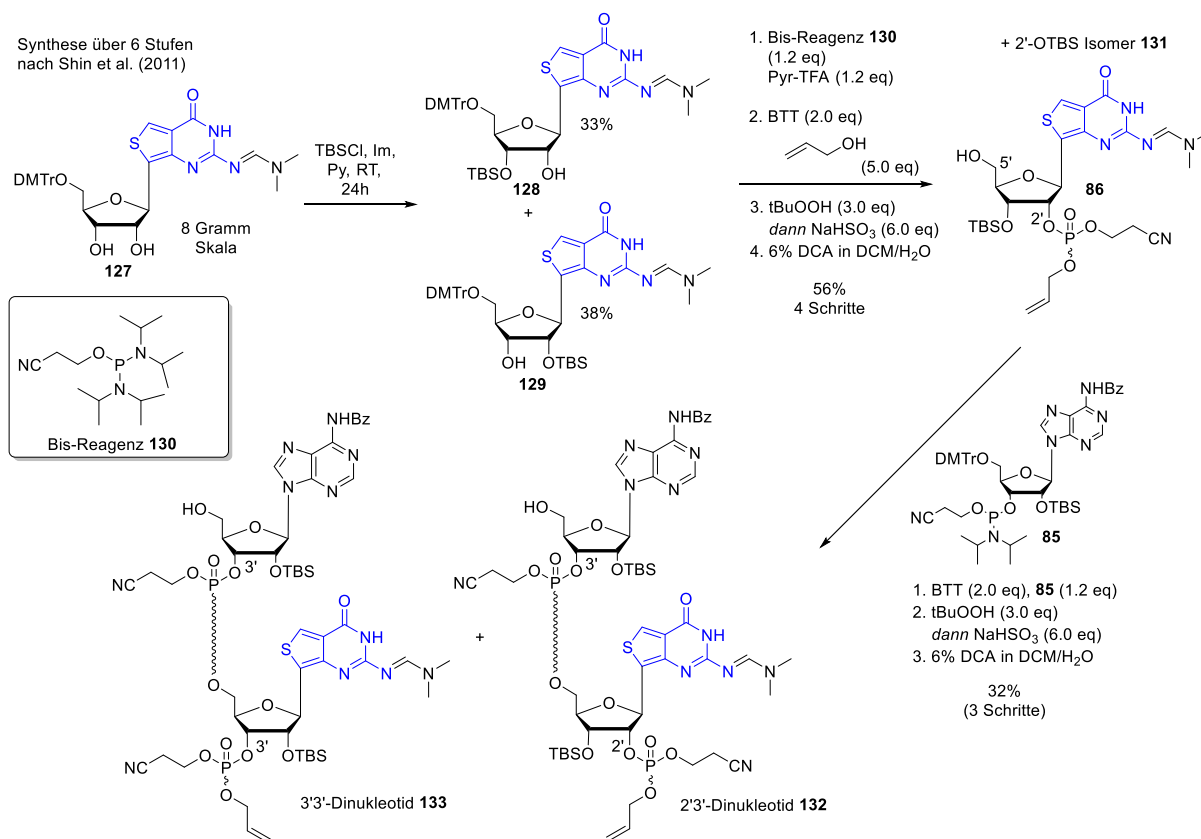


Abbildung 50: Synthese der linearen 2'3'- und 3'3'-Dinukleotide (**132** und **133**). In Zusammenarbeit mit Simon Veth.

Die Allylschutzgruppe von Verbindungen **132** und **133** wurde mithilfe von Natriumiodid nukleophil entfernt und die Phosphatzyklisierung durch *N*-Methylimidazol und 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (TPSCI) eingeleitet (Abbildung 51). Die beiden Reagenzien wurden dafür im 50-fachen Überschuss eingesetzt. Das zyklisierte 2'3'- (**135**) und 3'3'-Produkt (**136**) wurde mit Ammoniak und Fluorwasserstoff entschützt und die beiden Zielverbindungen 2'3'-TorGAMP (**69**) und 3'3'-TorGAMP (**137**) als Rohprodukt bereitgestellt. Durch Lösemittelfällung konnte das Gemisch vorgereinigt werden, so dass die beiden zyklischen Produkte über eine erste HPLC mit Triethylammoniumacetat-Puffer (Abbildung 52) und drei anschließende Entsalzungsschritte mit Trifluoressigsäure-Puffer sauber im 20 mg Maßstab isoliert werden konnten (Abbildung 53 und Abbildung 54).

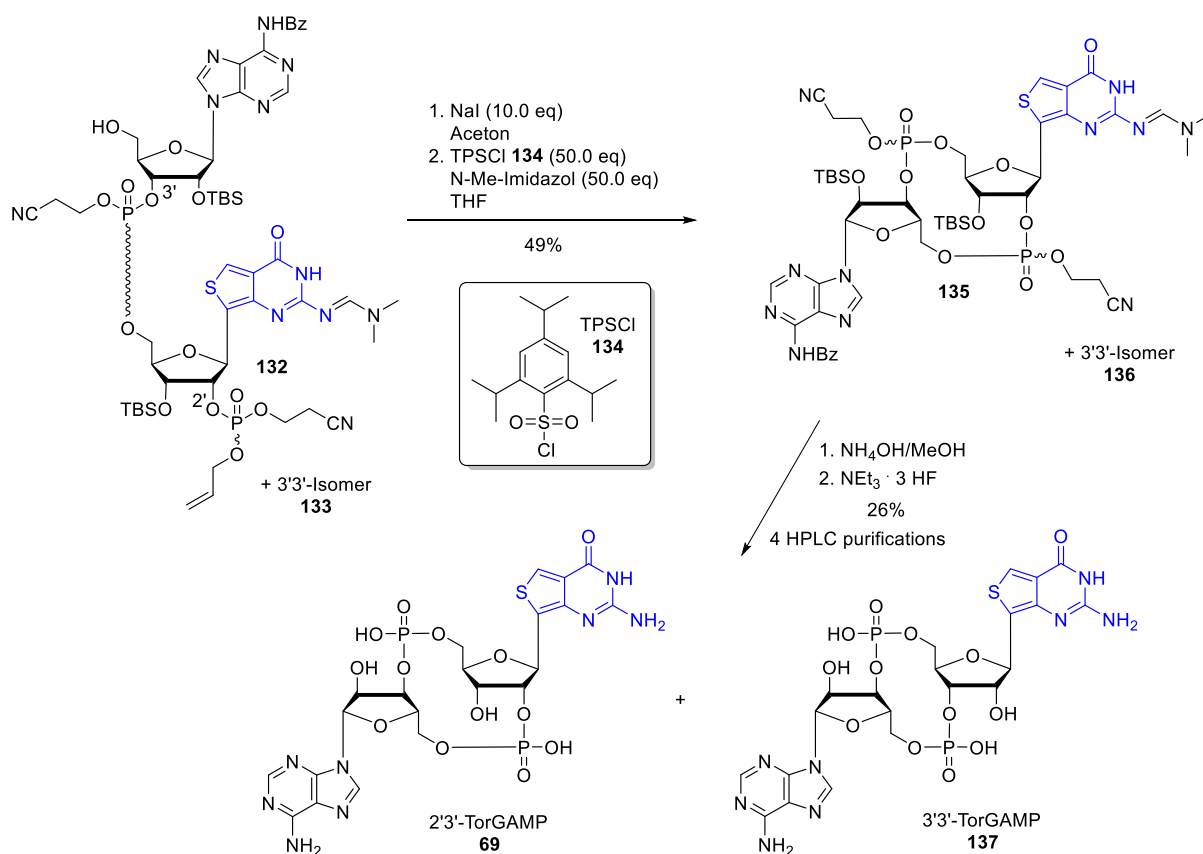


Abbildung 51: Synthese von 2'3'-TorGAMP (69) und 3'3'-TorGAMP (137). TPSCI = 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonylchlorid. In Zusammenarbeit mit Simon Veth.

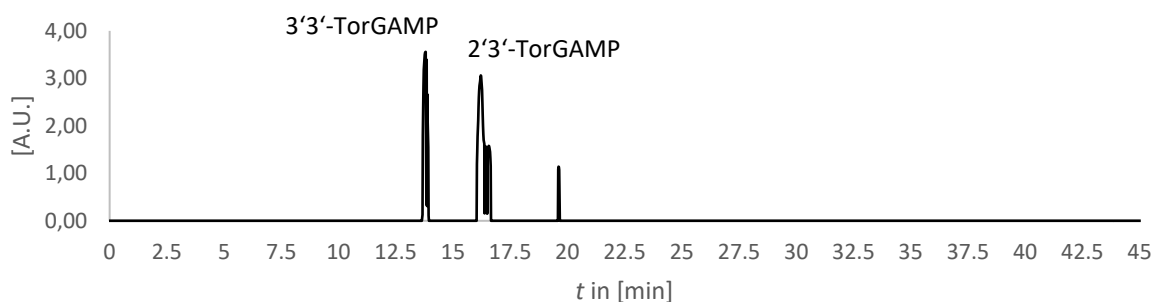


Abbildung 52: Erste HPLC-Trennung mit Triethylammoniumacetat-Puffer. Trennung von 2'3'-TorGAMP und 3'3'-TorGAMP.

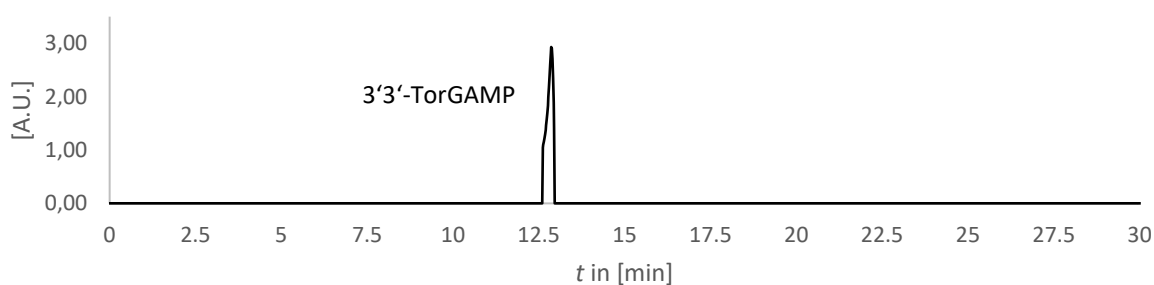


Abbildung 53: 3'3'-TorGAMP (137) nach dritter HPLC-Aufreinigung mit 0.1 % Trifluoressigsäure-Puffer ($R_t = 12.9$ min).

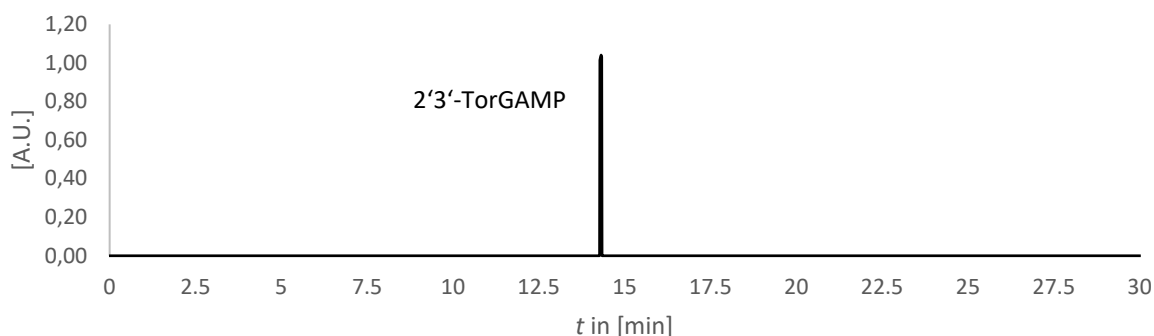


Abbildung 54: 2'3'-TorGAMP (69) nach drei HPLC Läufen mit 0.1 % Trifluoressigsäure-Puffer ($R_t = 14.3$ min).

4.3.2. Bestimmung der Phosphodiester-Konnektivität der TorGAMP-Isomere

Die beiden Verbindungen 2'3'-TorGAMP (69) und 3'3'-TorGAMP (137) wurden nachfolgend durch NMR-Methoden im Lösemittel D_2O charakterisiert. Dafür wurden 1H , ^{13}C , ^{31}P , COSY, NOESY, TOCSY, 1H - ^{13}C -HSQC und 1H - ^{13}C -HMBC (800 MHz NMR) Spektren aufgenommen. Diese Techniken liefern jedoch keinen hinreichenden Beweis für die 2'-5'- oder 3'-5'-Konnektivität der entscheidenden Phosphodiesterbrücke von P-1 (rot, Abbildung 55). Während Gao et al.^[44] die Phosphodiesterverknüpfungen in natürlichem 2'3'-cGAMP über Kristallstrukturanalyse bestimmten, unterschieden Diner et al.^[180] die beiden Isomere 2'3'-cGAMP und 3'3'-cGAMP durch ein 1H - ^{31}P -HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) Spektrum voneinander. Durch dieses Experiment können die starken 3J - und schwachen 4J -Kopplungen der Phosphoratome mit den 2'- und 3'-Protonen der jeweiligen Riboseeinheiten sichtbar gemacht werden.

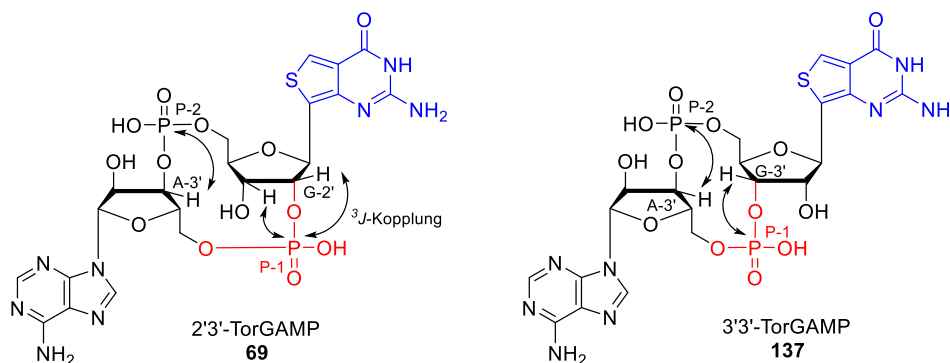


Abbildung 55: Bestimmung der Phosphodiester-Konnektivität (rot) der beiden TorGAMP Isomere mithilfe der NMR-Methode 1H - ^{31}P -HMBC.

Bei 2'3'-TorGAMP (69) konnten starke 3J -Kopplungen vom P-1 mit dem G-2'H und vom P-2 mit dem A-3'H beobachtet werden. Zusätzlich wurden etwas schwächere 4J -Kopplungen vom P-1 mit dem G-3'H detektiert. Unspezifischere Kontakte von Phosphor und 5'-Protonen traten ebenfalls auf. Da das Lösemittel D_2O die Signale der maßgeblichen A-3'H- und G-2'H-Protonen verdeckte, wurde das Experiment bei 50°C wiederholt. Dadurch wurden die Kontakte ersichtlicher, da die Signale vom Lösemittel tieffeldverschoben detektiert und nicht mehr verdeckt wurden (Abbildung 56).

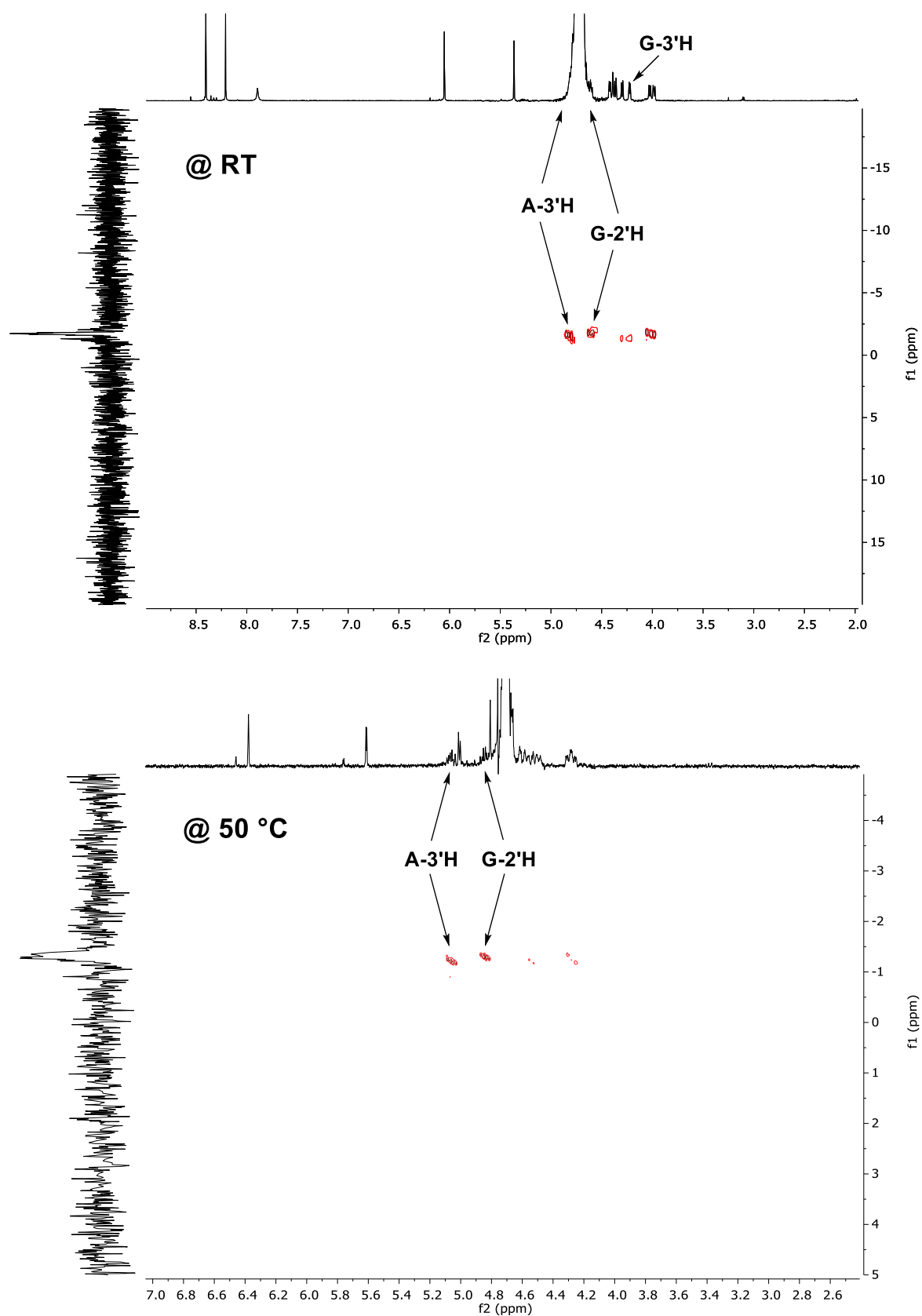


Abbildung 56: Überprüfung der 2'3'-TorGAMP (69) Konnektivität mithilfe von ^1H - ^{31}P -HMBC bei RT (oben) und 50 °C (unten). Bei erhöhter Temperatur wurde die Qualität des ^1H -Spektrums schlechter.

Im Vergleich dazu zeigte 3'3'-TorGAMP (**137**) ausschließlich 3J -Kopplungen zwischen dem P-1 mit dem G-3'H und dem P-2 mit dem A-3'H, jedoch keinen Phosphorkontakt mit dem G-2'H (Abbildung 57).

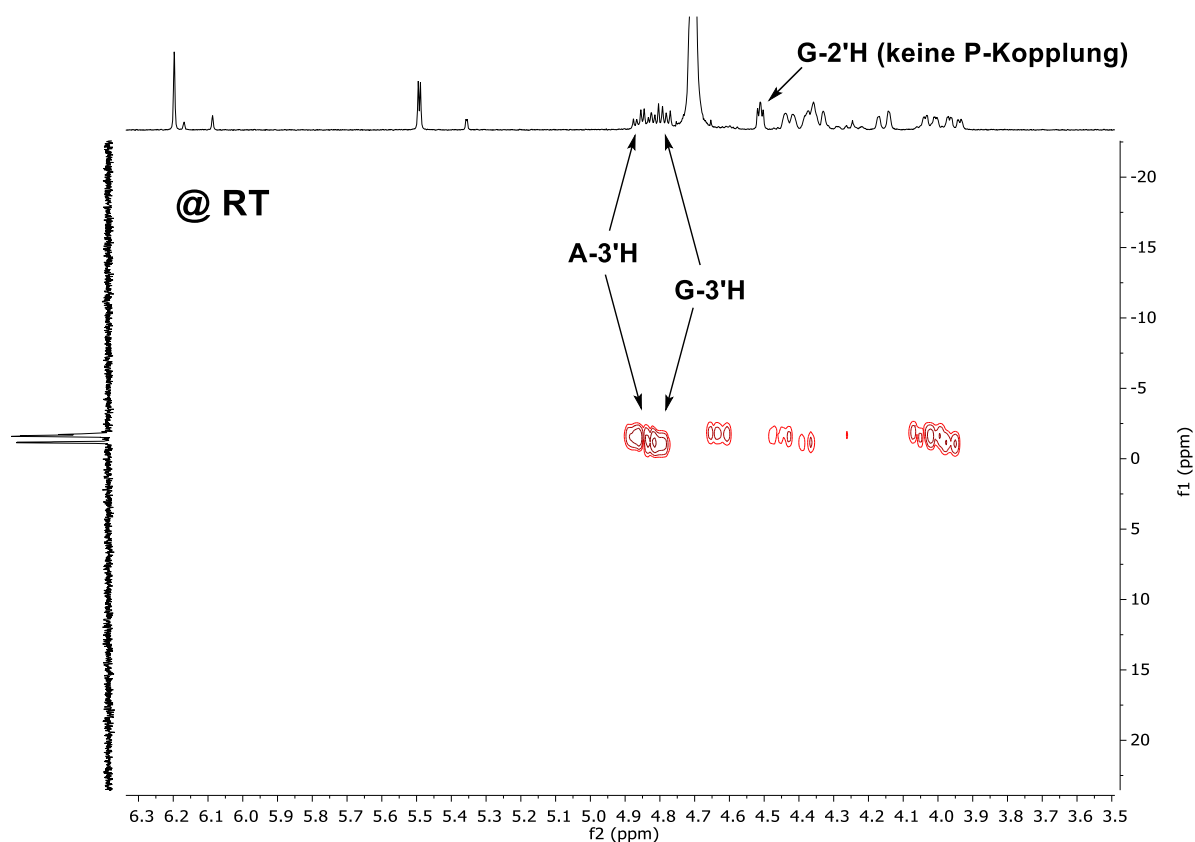


Abbildung 57: Überprüfung der 3'3'-TorGAMP (**137**) Konnektivität mithilfe von ^1H - ^{31}P -HMBC bei RT. Kein P-1-G-2'H Kontakt sichtbar.

4.3.3. Absorption und Fluoreszenz von 2'3'-TorGAMP

Die Fluoreszenzeigenschaften von 2'3'-TorGAMP (**69**) wurden mit einem Spektrometer (Nanophotometer NP80) gemessen (Abbildung 58). Die Absorptionsmaxima befinden sich bei 260 nm und bei 310 nm. Die Fluoreszenz liegt bei 453 nm (nach Anregung bei 310 nm). Diese Messungen decken sich mit den Daten des einzelnen Tor-Nukleosids.^[150] Die Bindung von 2'3'-TorGAMP an STING wurde anhand der Fluoreszenzeigenschaften genauer untersucht. Denn die Fluoreszenzintensität hängt entscheidend von der Protein-Mikroumgebung ab.

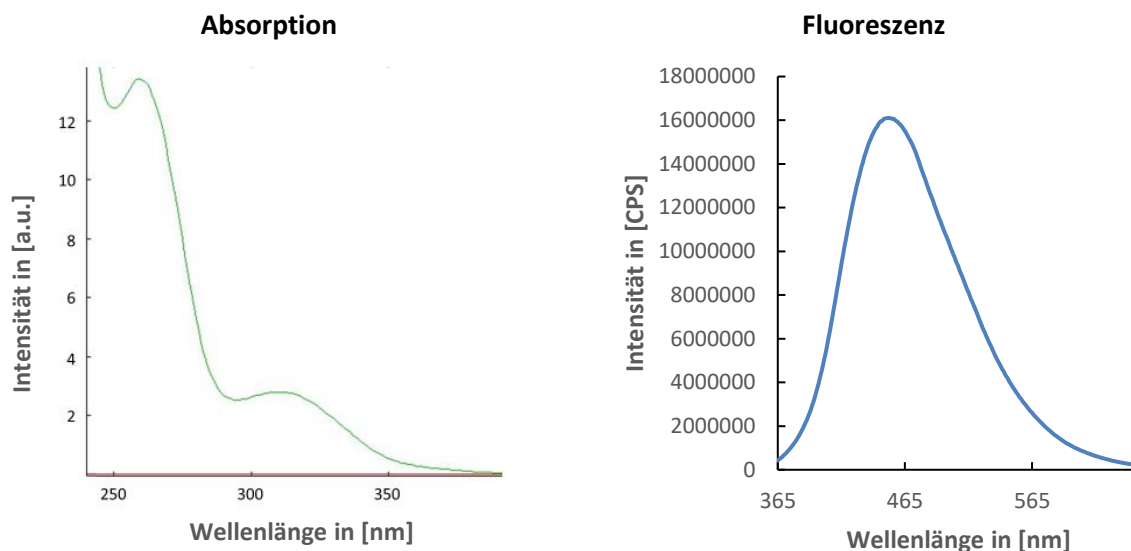


Abbildung 58: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektrum (rechts) von 2'3'-TorGAMP (69). Die Messung wurde von Dr. David Drexler durchgeführt. a.u. = *arbitrary units*, CPS = *counts per second*.

Dazu wurde ein Titrationsexperiment von Protein zu Ligand angesetzt. In eine wässrige 2'3'-TorGAMP-Lösung (200 μM , 100 μL /well) wurden unterschiedliche mSTING-Konzentrationen gegeben und die Fluoreszenz bei 260 nm Anregungswellenlänge detektiert. Mit steigender mSTING-Menge nahm die Fluoreszenzintensität von 2'3'-TorGAMP (69) ab (Abbildung 59). Als Grund dafür kann beispielsweise die Begünstigung für strahlungslose Relaxationen von 2'3'-TorGAMP durch die Proteinumgebung angenommen werden. Oder die Tatsache, dass der Ligand abgeschirmt wird.

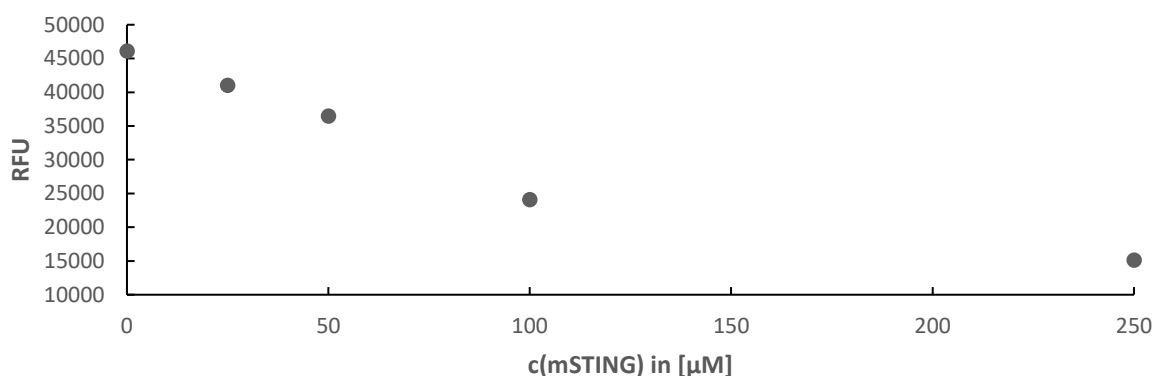


Abbildung 59: Die Fluoreszenzintensität von 2'3'-TorGAMP (69) in Abhängigkeit der anwesenden mSTING Konzentration. RFU = *relative fluorescence unit*. Die Messung wurde von Dr. David Drexler in einem Tecan platereader bei 30.1 °C durchgeführt.

4.3.4. Bindungsaffinität zu mSTING und hSTING

Des Weiteren wurde die Bindungsaffinität zu mSTING und hSTING (jeweils die C-terminale Proteindomäne, siehe Dialer et al.^[171]) über DSF und ITC untersucht. Die DSF-Messung für mSTING ergab eine geringere Verschiebung der Schmelztemperatur von 2'3'-TorGAMP (12.5 °C) als bei natürlichem 2'3'-cGAMP (25.5 °C, Abbildung 60). Noch kleiner waren die Werte für 3'3'-TorGAMP (8 °C) im Gegensatz zu 3'3'-cGAMP (18 °C).

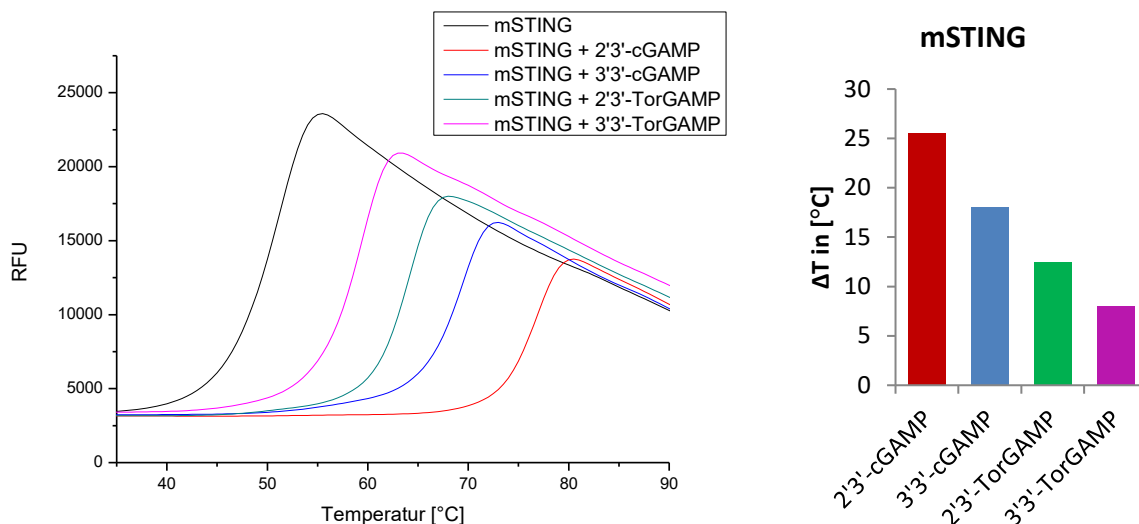


Abbildung 60: Differential Scanning Fluorimetry (DSF) Experiment mit 10 μm mSTING + 500 μm Ligand. Es wird die Schmelzpunktverschiebung (ΔT) des mSTING-Ligand-Addukts gemessen im Vergleich zu mSTING ohne Ligand. RFU = relative fluorescence unit. Die Messung wurde von Dr. David Drexler durchgeführt.

Mithilfe von ITC wurde die Dissoziationskonstante k_D von 2'3'-TorGAMP zu mSTING bestimmt. Der Wert war $k_D = 360 \pm 56$ nM (Abbildung 61). Das ist deutlich geringer als bei 2'3'-cGAMP (ca. 4 nM^[47]). Der fallende Kurvenverlauf der ermittelten Bindungsenthalpie spricht für eine endotherme Bindung.

ITC: mSTING + 2'3'-TorGAMP (69)

$$k_D = 360 \pm 56 \text{ nM}$$

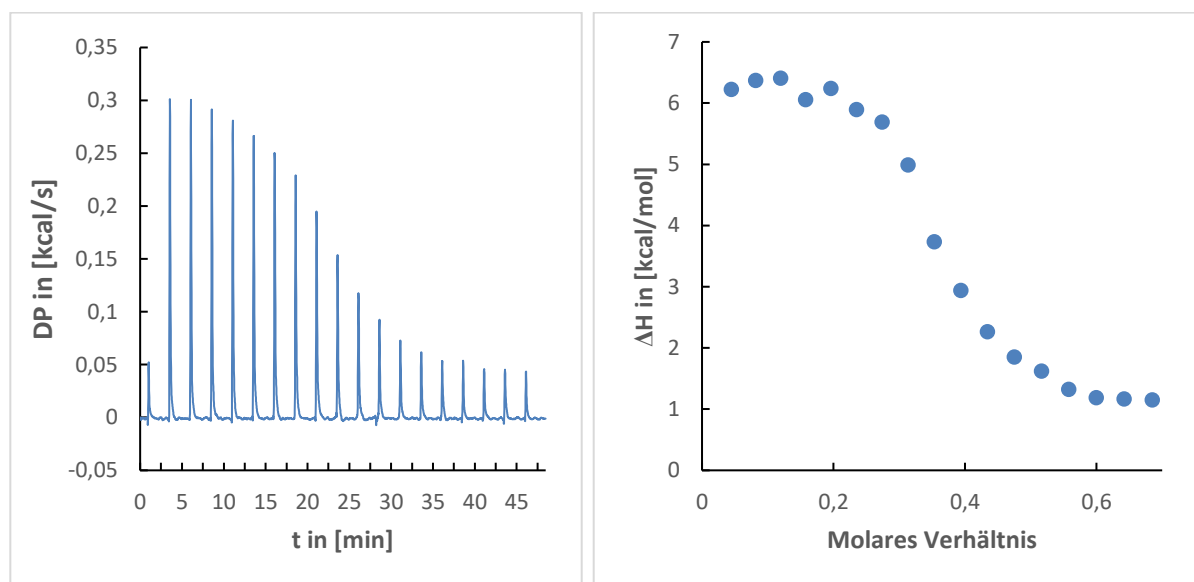


Abbildung 61: Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) von 200 μM 2'3'-TorGAMP (69) von 52 μM mSTING. Links: der gemessene Energieunterschied zur Referenz (DP = differential power) in Abhängigkeit der Zeit. Rechts: die ermittelte Enthalpie ΔH in Abhängigkeit der molaren TorGAMP-STING Zusammensetzung. Die Messung wurde von Dr. David Drexler durchgeführt.

Die Bindungsdaten für 2'3'-TorGAMP und hSTING zeigen zusätzlichen Optimierungsbedarf auf. Für die Schmelzpunktverschiebung von 2'3'-TorGAMP wurden nur 2 °C detektiert, für die isomere Verbindung 3'3'-TorGAMP ergab sich überhaupt kein Unterschied (Abbildung 62).

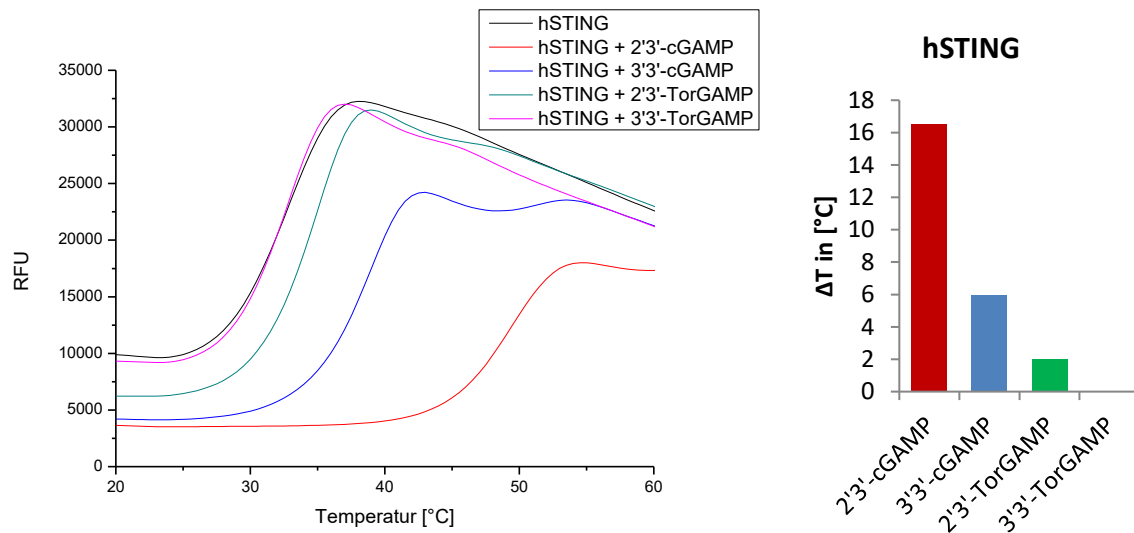


Abbildung 62: Differential Scanning Fluorimetry (DSF) Experiment mit 10 μM hSTING + 500 μM Ligand. Es wird die Schmelzpunktverschiebung (ΔT) des hSTING-Ligand-Addukts gemessen im Vergleich zu hSTING ohne Ligand. RFU = *relative fluorescence unit*. Die Messung wurde von Dr. David Drexler durchgeführt.

Die Dissoziationskonstante k_D von 2'3'-TorGAMP wurde mittels ITC bestimmt. Der Wert war $k_D = 15.3 \pm 3.9 \mu\text{M}$. Für die Messung bei hSTING (690 μM) wurde mehr als dreimal so viel Ligand benötigt wie bei mSTING (200 μM). Selbst 3'3'-cGAMP bindet laut Zhang et al.^[47] mit etwa $k_D = 1 \mu\text{M}$ (Abbildung 63) und damit mit einer höheren Affinität. Der steigende Kurvenverlauf der ermittelten Bindungsenthalpie spricht für eine exotherme Bindung.

ITC: hSTING + 2'3'-TorGAMP (69)

$$k_D = 15.3 \pm 3.9 \mu\text{M}$$

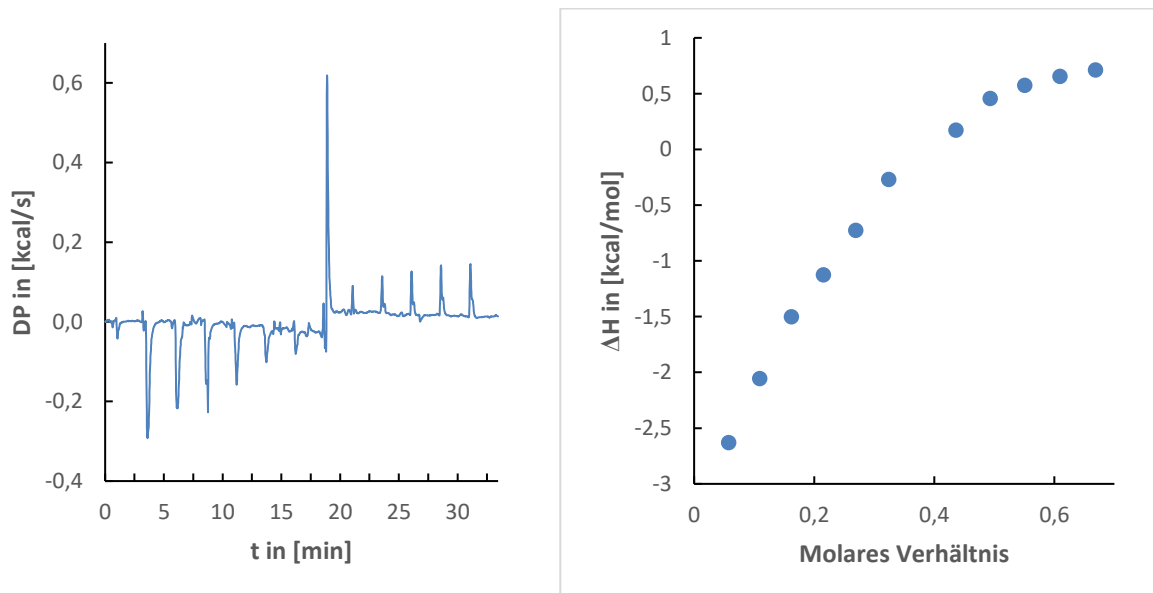


Abbildung 63: Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) von 690 μM 2'3'-TorGAMP (69) mit 200 μM hSTING. Links: der gemessene Energieunterschied zur Referenz (DP = *differential power*) in Abhängigkeit der Zeit. Rechts: die ermittelte Enthalpie ΔH in Abhängigkeit der molaren TorGAMP-STING Zusammensetzung. Die Messung wurde von Dr. David Drexler durchgeführt.

Die Kurvenverläufe der ITC-Messungen geben zusätzlich Aufschluss über das thermodynamische Potential ΔG der TorGAMP-STING-Bindung. Dieses setzt sich über die sogenannte Gibbs-Helmholtz-Gleichung aus einem Term von Enthalpie (ΔH), Temperatur (T) und Entropie (ΔS) zusammen:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Demzufolge sind beide Protein-Ligand-Bindungen exergonisch: $\Delta G_{\text{mSTING}} = -8.8 \text{ kcal/mol}$ und $\Delta G_{\text{hSTING}} = -6.2 \text{ kcal/mol}$. Bei der Bindung von 2'3'-TorGAMP an mSTING handelt es sich um eine entropisch begünstigte Bindung (-14.3 kcal/mol). An hSTING weist der positive Term ($+0.9 \text{ kcal/mol}$) von $-T\Delta S$ auf ein entropisch ungünstiges System hin. Bei der Enthalpie verhält es sich umgekehrt. Die Bindung von 2'3'-TorGAMP an mSTING ist endotherm ($+5.5 \text{ kcal/mol}$) und an hSTING exotherm (-7.1 kcal/mol). Trotz dieser Unterschiede bleiben beide Protein-Ligand-Bindungen aufgrund der sogenannten Enthalpie-Entropie-Kompensation exergonisch. Bei mSTING ist 2'3'-TorGAMP zwar ein schlechter Binder, das Gesamtsystem wird jedoch flexibel gehalten. Bei hSTING herrscht eine gute Bindung, aber die Bewegung ist eingeschränkt. Was die tatsächlichen Gründe für die entropischen und enthalpischen Werte sind, lässt sich aus den ITC-Daten alleine nicht aussagen (Abbildung 64).

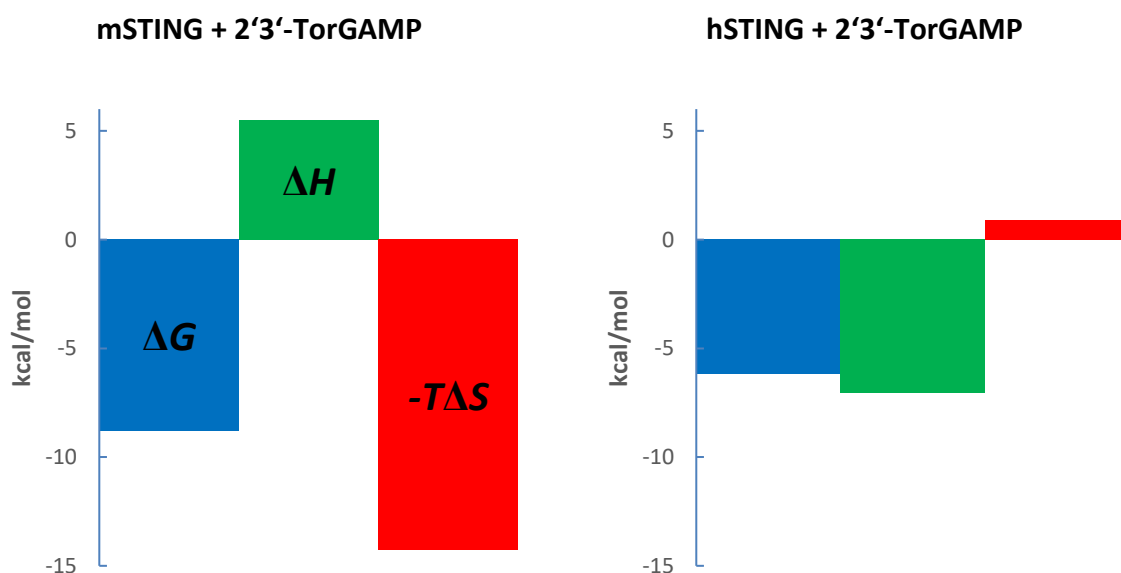


Abbildung 64: Vergleich der thermodynamischen Daten ΔG (blau), ΔH (grün) und ΔS (rot) der beiden ITC-Messungen von 2'3'-TorGAMP mit mSTING (links) und hSTING (rechts). In beiden Fällen ist die Bindung exergonisch. Dagegen verhalten sich ΔH und ΔS umgekehrt. Die Messung wurde von Dr. David Drexler durchgeführt.

Als Fazit lässt sich festhalten, dass die 7-CH- und 8-S-Substitution der Guanin-Nukleobase in 2'3'-TorGAMP drastische Auswirkungen auf die Bindung zu STING hat. Eine zugehörige Kristallstruktur von Protein und Ligand würde Klarheit über die veränderten Bindungsinteraktionen liefern. Allerdings ist eine Co-Kristallisation von 2'3'-TorGAMP (69) und STING aufgrund der geringen Bindungsaffinität äußerst schwierig. Ohne diese lässt sich jedoch nur mutmaßen, dass innerhalb der substituierten Region wichtige Bindungen unterbrochen bzw. verschlechtert wurden (vor allem durch die fehlende 7-N Akzeptorfähigkeit). Eventuell ist das Schwefelatom zu groß im Gegensatz zu einer CH-Gruppe. Bei *in cellulo* Experimenten mit 293T Reporter Zellen wiesen Novotná et al.^[155] in ihrer Publikation von 2019 auf schlechte EC_{50} -Werte von enzymatisch synthetisiertem 2'3'-TorGAMP hin: $EC_{50}(2'3'\text{-TorGAMP}) = 240.6 \mu\text{M}$ im Vergleich zu $EC_{50}(2'3'\text{-cGAMP}) = 13.7 \mu\text{M}$. Etwa zeitgleich erhielten wir unsere *in vitro* Bindungsdaten. Die unterschiedliche Bindung von 2'3'-TorGAMP zu mSTING und

hSTING erinnert auch an die Beobachtungen im Zuge der Studien von DMXAA, die in Kapitel 1.5 diskutiert wurden.

5. Fazit

Der *second messenger* 2'3'-cGAMP (**1**) besitzt zentrale Modulatoreigenschaften während der angeborenen Immunantwort der Zelle. Die Bindung an STING löst über die Expression von Interferonen eine nachgelagerte Entzündungsreaktion aus – ein deutliches Signal von Gefahr für den Organismus. Bei der Krankheitsbekämpfung im Menschen wird die Modulation des Immunsystems immer wichtiger, da die Beseitigung von Zellen, die aus dem Gleichgewicht geraten sind, viel selektiver und mit weniger Nebenwirkungen stimuliert werden kann. Bei Krebs, viralen Infektionen und Autoimmunerkrankungen sollte das nicht vernachlässigt werden. Dem Immunotransmitter 2'3'-cGAMP und dessen Analoga werden daher große therapeutische Potenziale zugeschrieben.

In der vorliegenden Dissertation wurden zwei 2'3'-cGAMP-Analoga auf chemischen Wegen synthetisiert: Eine neutral geladene und eine fluoreszierende Variante (Abbildung 65). Das Schlüsselmerkmal von 2'3'-cGAMP ist die nicht kanonische 2'-5'-Phosphodiesterverknüpfung, die die extrem hohe Bindungsaffinität zum zugehörigen STING-Protein ermöglicht. Die Konnektivität erschwert die chemische Laborsynthese, da die bisherige literaturbekannte Phosphorchemie im Zusammenhang mit DNA und RNA vor allem die Herstellung von 3'-5'-Verknüpfungen erschließt. Außerdem erhöhen die beiden Phosphodiesterbrücken zwar die Wasserlöslichkeit von 2'3'-cGAMP, aber die negativen Ladungen verschlechtern die Permeation der Verbindung durch die Zellmembran. Alternative Herangehensweisen sind dringend indiziert.

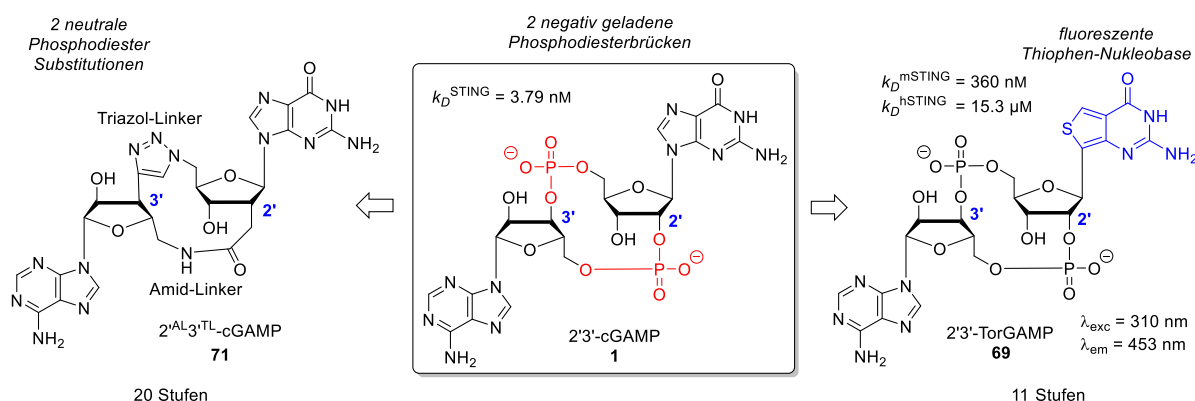


Abbildung 65: Die chemische Synthese der zwei 2'3'-cGAMP-Derivate **71** und **69** war Inhalt dieser Dissertation.

In einem ersten cGAMP-Monophosphat-Ansatz (Kapitel 3.1) sollte lediglich eine der zwei Phosphodiesterbrücken ersetzt werden. Diese Machbarkeitsstudien ergaben, dass sich für die 2'-5'-Verknüpfung eine synthetische Amidbindung besonders eignete.

In der darauffolgenden Herangehensweise (Kapitel 3.2) wurde zusätzlich die 3'-5'-Verknüpfung mit einem Triazol-Linker substituiert (Abbildung 66). Dadurch erhielt Molekül **71** einen neutral geladenen Charakter und potenzielle Membrangängigkeit. Eine mögliche Verschlechterung der Bindungsaffinität zu STING wurde in Kauf genommen, solange die pharmakokinetischen Eigenschaften verbessert wurden. Sprich: Sofern der IC_{50} -Wert kleiner würde, könnte der halbmaximale Effekt (EC_{50}) immer noch größer sein, da sich die Botenstoff-Konzentration in der Zelle leichter erhöhen lässt. Zudem kann die Persistenz durch nicht verseifbare Nukleotid-Linker gesteigert werden. Die Schwierigkeit dieser Syntheseroute lag in einer adäquaten und orthogonalen Schutzgruppenchemie, die unter Berücksichtigung der Schwerlöslichkeit von freien Purinbasen die jeweiligen chemischen Reaktionen

selektiv ermöglichte. Nach 20 Schritten konnten 100 mg von 2'^{AL}3'^{TL}-cGAMP (**71**) gewonnen werden (entspricht 1 % Gesamtausbeute).^[171]

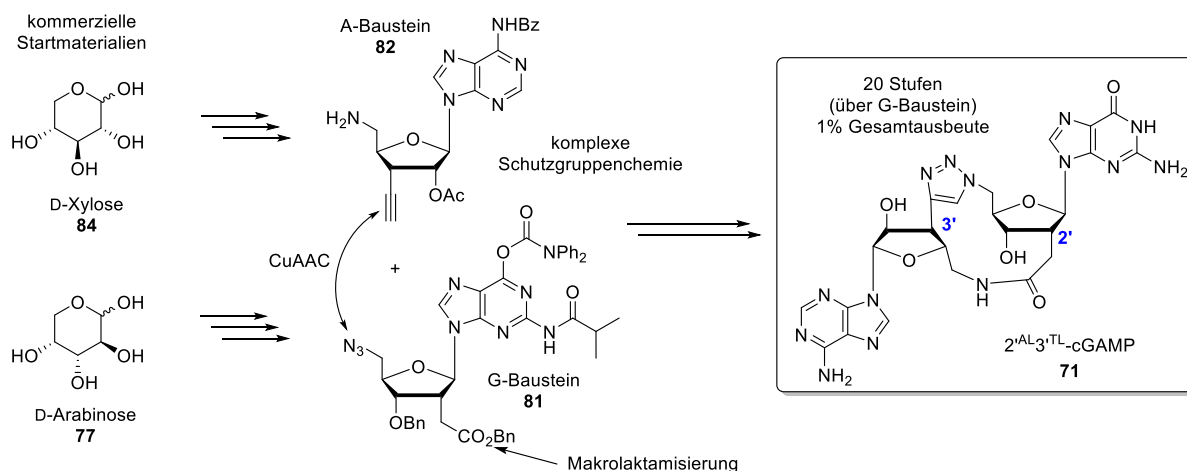


Abbildung 66: Synthese des neutral geladenen amid- und triazolverknüpften 2'^{AL}3'^{TL}-cGAMP (**71**) in 20 Stufen.

Ein letzter Ansatz (Kapitel 3.3) beinhaltete die Synthese eines fluoreszierenden 2'3'-cGAMPs – das sogenannte 2'3'-TorGAMP (**69**). Auf Grundlage der Chemie von Yitzhak Tor wurde eine Thiophen-basierte fluoreszente Guaninbase in das 2'3'-cGAMP-Gerüst integriert. Vorausgegangene Studien attestierten dieser „Tor“-Base eine hohe strukturelle Verwandtschaft in Kombination mit vergleichsweise hohen Extinktionskoeffizienten. Die Fluoreszenzeigenschaften von 2'3'-TorGAMP sollten Aufschluss über die Mikroumgebung von STING geben und zu einem wertvollen Liganden bei Verdrängungsexperimenten leiten.

Die Substanz 2'3'-TorGAMP (**69**) zeigte bei *in vitro* Experimenten wie DSF und ITC akzeptable Bindung zu murinem STING auf ($k_D^{\text{mSTING}} = 360 \text{ nM}$) und bietet so neue Möglichkeiten zur Untersuchung grundlegender Prozesse *in cellulo*. Für die Übertragung auf das humane System ($k_D^{\text{mSTING}} = 15.3 \text{ } \mu\text{M}$) sind weitere Optimierungen nötig und die voneinander abweichenden Bindungsaffinitäten erinnern an den mSTING-spezifischen Binder DMXAA (**15**) aus Kapitel 1.5. Mögliche Bildgebungsverfahren mithilfe von 2'3'-TorGAMP über 2-Photonen-Absorptions-Mikroskopie ist Aufgabe von zukünftiger Forschung.

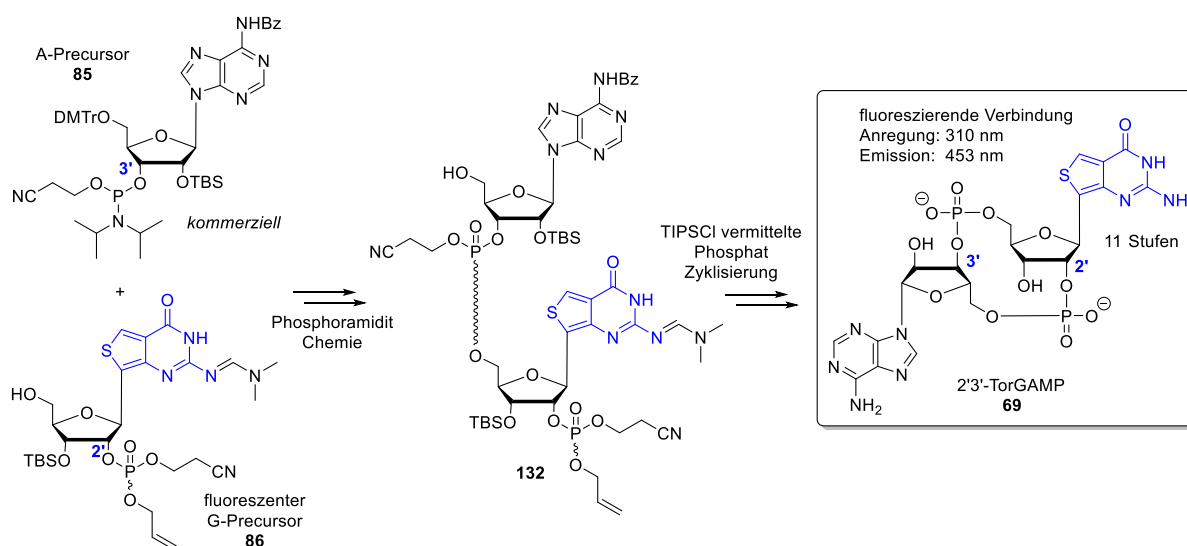


Abbildung 67: Synthese des fluoreszierenden 2'3'-TorGAMP (**69**) in 11 Stufen.

Diese Dissertation sollte einen Beitrag leisten das angeborene Immunsystem genauer zu untersuchen und zu begreifen. Ein Zusammenschluss von interdisziplinären und internationalen LMU-Forschergruppen versuchte mit chemischen und biochemischen Methoden tiefgreifende Erkenntnisse zu erlangen, wie ein Organismus sein Überleben sichern kann.

Wie widerstandsfähig ist eine Zelle gegen externe Angreifer? Wie kommunizieren Zellen im Falle eines Krankheitsbefalls? Was bedeutet es für das Zellgleichgewicht, wenn von außen künstlich eingegriffen wird? Die Aufklärung von Stoffwechselwegen in der Zelle und vielmehr die Erforschung von Krankheiten im Zusammenhang mit dem Immunsystem birgt Hoffnung in Bezug auf zukünftige Immuntherapien.

Wenn wir erfassen, warum der Zellzyklus aus dem Gleichgewicht gerät, können wir auch Wege finden, das Gleichgewicht wiederherzustellen – soweit die Überlegung und Motivation. Die Jahrhunderte des analogen Denkens werden derzeit durch die digitale Kommunikation revolutioniert. Vielleicht wird durch die Erschließung der Zellkommunikation eine weitere wichtige Tür auf dem Weg zur vollkommenen Kommunikation geöffnet.

EXPERIMENTELLER TEIL

6. Experimentelle Details

Alle Reaktionen wurden magnetisch unter Stickstoff Atmosphäre gerührt. Dafür wurden die Reaktionsgefäße vorher unter Vakuum und bei 550 °C ausgeheizt. Feuchtigkeits- oder Sauerstoffsensitive Reaktionen wurden außerdem unter einem positiven Druck von Stickstoff oder Argon ausgeführt. Reaktionen bei tiefen Temperaturen wurden entweder mit einem Eisbad, Aceton-Trockeneisbad (-78 °C) oder Kryostaten gekühlt. Trockene Lösemittel (z.B. DCM, THF, DMF, Pyridin, DMSO) und Reagenzien wurden von folgenden Anbietern käuflich erworben: Sigma-Aldrich, Acros Organics, Carbosynth, TCI Europe, ABCR, VWR. Wenn nötig wurden diese Chemikalien unter einem Septum und über Molekularsieb aufbewahrt. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien in der Qualität benutzt, wie sie gekauft wurden.

Der Reaktionsfortschritt und die Fraktionen aus der Säulenchromatographie wurden über Dünnschichtchromatographie (DC, Silica Gel 60-F₂₅₄ Platten von Merck) kontrolliert und über UV-Licht (254 nm oder 366 nm) visualisiert. Zusätzlich konnten diese Proben mit einem *p*-anisaldehyde Stain bunt angefärbt werden. Die Zusammensetzung dafür ist: *p*-anisaldehyde (3.7 mL), EtOH (135 mL), konz. H₂SO₄ (5 mL) und konz. AcOH (1.5 mL). Die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie erfolgte mit Silica Gel (Merck, Partikelgröße 0.063 – 0.200 mm). Die zugehörigen Lösemittelsysteme wurden vorab über DC bestimmt. Die Eluenten waren z.B. Isohexan/Ethylacetat oder Dichlormethan/Methanol Gemische. Der Säulendurchmesser, die Fraktionsgröße und die Menge an Silica gel wurden anhand der Parameter von Still et al.^[181] bestimmt.

Als zusätzliche Methode der Reaktionskontrolle wurde ein RP-LCMS (*Reversed Phase Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) System eingesetzt. Die isolierten Verbindungen oder rohe Reaktionsgemische wurden in Acetonitril oder Aceton gelöst und in ein Thermo Fisher LCMS System injiziert. Dieses ist mit einem DIONEX UltiMate 3000 HPLC System (Pumpe, Auto Sampler, Säulenkompartment und *diode array detector*), einer Hypersil Gold C18 Selektivitätssäule (100 × 2.1 mm) und einem *MSQ Plus single-quadrupole mass spectrometer* ausgestattet. Die Methode der LCMS Analyse ist hier aufgelistet (flow rate: 0.6 mL/min):

T / min	0.0	7.0	7.5	8.0
A (H ₂ O) / %	95	20	5	5
B (MeCN) / %	5	80	95	95

Die Aufreinigung von sehr polaren oder über Säulenchromatographie schwer trennbaren Substanzen wurde von einer Waters 2695 *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) vollstreckt (z.B. die Dinukleotide **24**, **25** und **4** von der ausgekoppelten Publikation dieser Doktorarbeit von Dialer et al.^[171]). Technische Details: Nucleosil Säulen (250/4 mm, C18ec, Partikelgröße 3 µm bei der analytischen HPLC und 250/10 mm, C18ec, 5 µm für die semipräparative HPLC) von Machery-Nagel mit einem H₂O/MeCN Eluentensystem. Wahlweise wurde zusätzlich ein 0.1 % TFA- oder 0.1 M Triethylammoniumacetatpuffer verwendet. Die jeweiligen Trennungsbedingungen sind bei den zugehörigen Reaktionsbeschreibungen zu finden. Das Wasser wurde über ein Milli-Q Plus System von Merck Millipore aufgereinigt. Acetonitril wurde bereits in HPLC-Reinheitsgrad gekauft.

7. Analytik

7.1. Nuclear Magnetic Resonance Spektroskopie (NMR)

NMR Spektren wurden im Institut für Organische Chemie (Department Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Verantwortlicher: Dr. David Stephenson) auf einem *Bruker Ascend 400* oder *Bruker ARX 600* bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Magnetfeldstärken betrugen 400 MHz, 600 MHz oder 800 MHz für ^1H -Kerne, 101 MHz oder 151 MHz für ^{13}C -Kerne, 80 MHz für ^{29}Si -Kerne und 162 MHz für ^{31}P -Kerne. Die chemische Verschiebung (δ) wird nach allgemeingültiger Konvention in *parts per million* (ppm) tieffeldverschoben zum Standard Tetramethylsilan (TMS) angegeben und mithilfe des verbleibenden undeuterten Lösemittelsignals nach Gottlieb et al.^[182] referenziert (z.B. CDCl_3 : $\delta(^1\text{H}) = 7.26$ ppm, $\delta(^{13}\text{C}) = 77.16$ ppm; $\text{DMSO-}d_6$: $\delta(^1\text{H}) = 2.50$ ppm, $\delta(^{13}\text{C}) = 39.52$ ppm, CD_3OD : $\delta(^1\text{H}) = 3.31$ ppm, $\delta(^{13}\text{C}) = 49.00$ ppm). Die Protonenspektren wurden mit der Größe des Integrals dargestellt und die Multiplizität abgekürzt mit s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), br (broad) und m (multiplet). Die Kopplungskonstante (J) wurde in Hertz (Hz) berichtet. Die Signalzuordnungen wurden zudem mit Unterstützung von 2D-NMR Techniken vorgenommen: *homonuclear correlation spectroscopy* (COSY), *nuclear Overhauser effect spectroscopy* (NOESY), *heteronuclear single quantum coherence* (HSQC) und *heteronuclear multiple bond coherence* (HMBC). Alle Spektren wurden mittels der Software MestReNOVA 10.0 von Mestrelab Research S. L. analysiert. Die Nummerierung und Nomenklatur der untersuchten Verbindungen sind zum teilweise einfacheren Verständnis nicht zwangsläufig im Einklang mit IUPAC. Um mögliche Säurereste in CDCl_3 zu entfernen wurde in das Lösemittelbehältnis (100 mL) etwa 5 g basisches Aluminiumoxid gegeben.

7.2. Infrarot Spektroskopie (IR)

Die IR Spektren wurden mithilfe eines *Perkin Elmer Spectrum BX FT-IR* Spektrometers mit Diamant-ATR (*Attenuated Total Reflection*) Ausstattung aufgenommen. Der Analysebereich lag zwischen 4500 cm^{-1} und 600 cm^{-1} . Die Proben wurden als Flüssigkeit oder Feststoff direkt auf den Probenkopf aufgetragen.

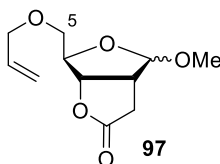
7.3. Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS)

Die hochauflösenden Massenspektren wurden am Institut für Organische Chemie (Department Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Verantwortlicher: Dr. Werner Spahl) auf einem *Thermo Finnigan MAT 95* (für EI) und einem *Thermo Finnigan LTQ FTICR* (für ESI) gemessen. Alle Proben wurden in Aceton, Acetonitril oder Wasser mit einer maximalen Konzentration von 0.1 mg/mL gelöst.

8. Experimentelle Vorschriften und Charakterisierung

8.1. Syntheseansätze in Richtung eines amidverknüpften Monophosphat-Analogons von 2'3'-cGAMP

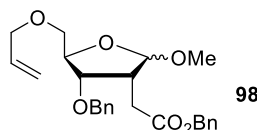
8.1.1. Methyl 5-O-Allyl-2-C-carboxymethyl-2-deoxy-2,3-lacton-D-ribofuranosid (97)



Lakton **76** (3.00 g, 15.9 mmol, 1.00 eq.) wurde nach einer Vorschrift von Dialer et al.^[171] synthetisiert und zusammen mit Allylbromid (4.13 mL, 5.79 g, 47.8 mmol, 3.00 eq.) in 110 mL DMF bei RT gelöst. Durch stückweises Zugabe von Natriumhydrid (0.77 g, 19.1 mmol, 1.20 eq., 60 % Dispersion in Mineralöl) entstand eine gelbgraue Suspension. Die Reaktion wurde 3 h bei RT gerührt und der Fortschritt über Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach vorsichtigem Quenchen der Reaktion durch brine und gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung (100 mL) wurde die Lösung mit EtOAc (4 x 150 mL) extrahiert, über wasserfreies MgSO₄ getrocknet, filtriert und *in vacuo* konzentriert. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, Isohexan/EtOAc, Hex→9:1→4:1) aufgereinigt und als farbloses Öl erhalten (2.88 g, 12.6 mmol, 79 %). $\alpha/\beta = 2:3$. Das β Anomer konnte für weitere Charakterisierung isoliert werden.

R_f (α Anomer)	0.24 (Isohexan/EtOAc = 2:1)
R_f (β Anomer)	0.19 (Isohexan/EtOAc = 2:1)
¹ H-NMR, COSY, NOESY	(400 MHz, CDCl ₃ , β Anomer): δ = 5.93 – 5.82 (m, 1H, OCH ₂ CH=CH ₂), 5.29 – 5.22 (m, 1H, OCH ₂ CH=CH ₂), 5.21 – 5.16 (m, 1H, OCH ₂ CH=CH ₂), 5.07 (d, ³ J = 5.2 Hz, 1H, H-1), 4.88 (dd, ³ J = 7.7 Hz, ³ J = 2.9 Hz, 1H, H-3), 4.32 – 4.28 (m, 1H, H-4), 4.09 – 3.97 (m, 2H, OCH ₂ CH=CH ₂), 3.65 (d, ³ J = 3.7 Hz, 2H, H-5), 3.35 (s, 3H, OCH ₃), 3.07 – 3.00 (m, 1H, H-2), 2.70 (dd, ² J = 17.7 Hz, ³ J = 1.4 Hz, 1H, CH ₂ COO), 2.51 (dd, ² J = 18.6 Hz, ³ J = 9.3 Hz, 1H, CH ₂ COO) ppm.
¹³ C-NMR, HSQC, HMBC	(100.6 MHz, CDCl ₃ , β Anomer): δ = 176.7 (C=O), 134.3 (OCH ₂ CH=CH ₂), 117.7 (OCH ₂ CH=CH ₂), 104.4 (C-1), 83.9 (C-3), 81.9 (C-4), 72.7 (OCH ₂ CH=CH ₂), 69.6 (C-5), 55.2 (OCH ₃), 44.1 (C-2), 29.1 (CH ₂ COO) ppm.
IR	(ATR, β Anomer): $\tilde{\nu}$ = 2923, 1777, 1450, 1352, 1203, 1161, 1032, 915, 726 cm ⁻¹ .
EI-HRMS	m/z für [C ₁₁ H ₁₆ O ₅ - H] ⁺ : berechnet: 227.0914 gefunden: 227.0907.

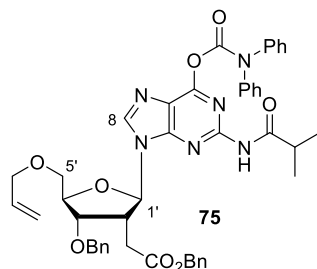
8.1.2. Methyl 5-*O*-Allyl-3-*O*-benzyl-2,5-dideoxy-2-*C*-[(benzyloxycarbonyl)methylen]-*D*-ribofuranosid (**98**)



Die Reaktionsbeschreibung richtete sich nach einer modifizierten Vorschrift von Webber et al.^[183] und Dialer et al.^[171]. Allyllakton **97** (2.50 g, 10.9 mmol, 1.00 eq.) wurde zusammen mit KOH-Plättchen (3.07 g, 54.8 mmol, 5.00 eq.) in THF (120 mL) bei RT suspendiert. Die Reaktionsmischung wurde mit Benzylbromid (7.81 mL, 11.2 g, 65.7 mmol, 6.0 eq.) versetzt und für 8 Stunden refluxiert. Die weiße Suspension wurde auf 0°C abgekühlt, mit Wasser (100 mL) verdünnt und mit EtOAc (3 x 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit brine (300 mL) gewaschen, über wasserfreies MgSO₄ getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck eingedampft. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, Isohexan/EtOAc, Hex→4:1→2:1) aufgereinigt und als gelbliches Öl erhalten (4.17 g, 9.78 mmol, 89 %). α/β = 2:3. Das β Anomer konnte für weitere Charakterisierung isoliert werden.

R_f (α Anomer)	0.73 (Isohexan/EtOAc = 2:1)
R_f (β Anomer)	0.68 (Isohexan/EtOAc = 2:1)
¹ H-NMR, COSY, NOESY	(400 MHz, CDCl ₃ , β Anomer): δ = 7.38 – 7.24 (m, 10H, aryl H), 5.94 – 5.80 (m, 1H, OCH ₂ CH=CH ₂), 5.28 – 5.21 (m, 1H, OCH ₂ CH=CH ₂), 5.20 – 5.15 (m, 1H, OCH ₂ CH=CH ₂), 5.09 (s, 2H, COOCH ₂ Ph), 4.98 (d, ³ J = 4.9 Hz, 1H, H-1), 4.54 (d, ² J = 12.5 Hz, 1H, OCH ₂ Ph), 4.44 (d, ² J = 12.5 Hz, 1H, OCH ₂ Ph), 4.24 – 4.20 (m, 1H, H-4), 3.98 – 3.95 (m, 2H, OCH ₂ CH=CH ₂), 3.90 (dd, ³ J = 7.4 Hz, ³ J = 2.6 Hz, 1H, H-3), 3.36 (s, 3H, OCH ₃), 3.35 – 3.31 (m, 2H, H-5), 2.73 – 2.69 (m, 2H, CH ₂ COO), 2.66 – 2.58 (m, 1H, H-2) ppm.
¹³ C-NMR, HSQC, HMBC	(100.6 MHz, CDCl ₃ , β Anomer): δ = 172.9 (C=O), 138.3 (COOCH ₂ Ph-C-1), 136.1 (OCH ₂ Ph-C-1), 134.6 (OCH ₂ CH=CH ₂), 128.7, 128.4, 128.29, 128.27, 128.24, 127.8 (aryl 10C), 117.4 (OCH ₂ CH=CH ₂), 105.8 (C-1), 83.2 (C-4), 79.1 (C-3), 72.6 (OCH ₂ CH=CH ₂), 72.3 (OCH ₂ Ph), 70.7 (C-5), 66.3 (COOCH ₂ Ph), 55.7 (OCH ₃), 43.2 (C-2), 28.8 (CH ₂ COO) ppm.
IR	(ATR, β Anomer): $\tilde{\nu}$ = 3034, 2907, 1731, 1497, 1454, 1278, 1168, 1027, 905, 734 cm ⁻¹ .
EI-HRMS	m/z für [C ₂₅ H ₃₀ O ₆ - H] ⁺ : berechnet: 425.1959 gefunden: 425.1956.

8.1.3. 9-[5-*O*-Allyl-3-*O*-benzyl-2,5-dideoxy-2-*C*-[(benzyloxycarbonyl)methylen]- β -D-ribofuranosyl]-6-*O*-(diphenylcarbamoyl)-2-*N*-isobutyrylguanin (75)



Die Reaktionsbeschreibung richtete sich nach einer modifizierten Vorschrift von Dialer et al.^[171]. Zu einer rührenden Suspension von Verbindung **98** (4.00 g, 9.38 mmol, 1.00 eq.) und 6-*O*-(Diphenylcarbamoyl)-2-*N*-isobutyrylguanin^[184,185] (5.86 g, 14.1 mmol, 1.50 eq.) in Dichlorethan (200 mL) wurde *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) (8.71 mL, 7.23 g, 35.6 mmol, 4.00 eq.) unter Stickstoff bei RT hinzugegeben und anschließend für 30 min auf 80°C erhitzt bis eine klare Lösung entstand. Wieder auf RT wurde Trimethylsilyltriflat (TMSOTf) (3.90 mL, 4.79 g, 21.6 mmol, 2.30 eq.) in die nun dunkelrote Reaktionsmischung getropft und 2 weitere Stunden bei 80°C gerührt. Die Reaktion wurde auf RT gebracht und durch Zugabe von wässriger gesättigter NaHCO₃-Lösung (80 mL) beendet. Das Phasengemisch wurde über eine Glasfilternutsche abfiltriert und das Filtrat mit Dichlormethan (4 x 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreies MgSO₄ getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck eingedampft. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, Isohexan/EtOAc, 4:1→2:1→1:1) aufgereinigt und als farbloser Schaum erhalten (4.96 g, 6.12 mmol, 65 %).

R_f 0.45 (Isohexan/EtOAc = 1:1)

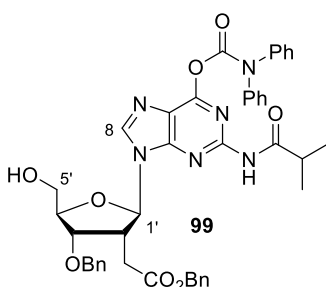
¹H-NMR, COSY, NOESY (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.27 (s, 1H, H-8), 7.91 (bs, 1H, NH), 7.50 – 7.17 (m, 20H, aryl-H), 6.13 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 1H, H-1'), 5.95 – 5.84 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 5.32 – 5.25 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 5.24 – 5.19 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 4.95 (s, 2H, COOCH₂Ph), 4.58 (d, ²*J* = 11.5 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.42 (d, ²*J* = 11.5 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.42 – 4.37 (m, 1H, H-3'), 4.37 – 4.32 (m, 1H, H-4'), 4.08 – 3.98 (m, 2H, OCH₂CH=CH₂), 3.70 (dd, ²*J* = 10.5 Hz, ³*J* = 4.1 Hz, 1H, H_a-5'), 3.55 (dd, ²*J* = 13.0 Hz, ³*J* = 3.3 Hz, 1H, H_b-5'), 3.39 – 3.31 (m, 1H, H-2'), 3.09 – 2.96 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2.95 (dd, ²*J* = 17.0 Hz, ³*J* = 9.6 Hz, 1H, CH₂COO), 2.51 (dd, ²*J* = 16.7 Hz, ³*J* = 5.3 Hz, 1H, CH₂COO), 1.25 (s, 3H, CH(CH₃)₂), 1.24 (s, 3H, CH(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 175.7 (CONH), 171.4 (C=O), 156.1 (OCONPh₂), 155.0 (C-4), 152.0 (C-6), 150.5 (C-2), 142.8 (C-8), 141.9 (OCON-Ph-C1), 137.5 (COOCH₂Ph-C-1), 135.6 (OCH₂Ph-C-1), 134.1 (OCH₂CH=CH₂), 129.3, 128.62, 128.57, 128.38, 128.35, 128.07, 128.00 (aryl 20C), 121.2 (C-5), 117.9 (OCH₂CH=CH₂), 88.3 (C-1'), 83.6 (C-4'), 80.5 (C-3'), 72.6 (OCH₂CH=CH₂), 72.1 (OCH₂Ph), 70.7 (C-5'), 66.6 (COOCH₂Ph), 45.4 (C-2'), 35.7 (CH(CH₃)₂), 29.8 (CH₂COO), 19.4 (CH(CH₃)₂), 19.3 (CH(CH₃)₂) ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2929, 1732, 1620, 1584, 1491, 1273, 1167, 904, 726 cm⁻¹.

ESI-HRMS	m/z für $[\text{C}_{46}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_8 + \text{H}]^+$:	berechnet: 811.3450
		gefunden: 811.3451.
	m/z für $[\text{C}_{46}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_8 - \text{H}]^-$:	berechnet: 809.3304
		gefunden: 809.3313.

8.1.4. 9-[3-*O*-benzyl-2,5-dideoxy-2-*C*-[(benzyloxycarbonyl)methylen]- β -D-ribofuranosyl]-6-*O*-(diphenylcarbamoyl)-2-*N*-isobutylguanin (99)



Die Reaktionsbeschreibung richtete sich nach einer modifizierten Vorschrift von Kitov et al.^[164] Zu einer Lösung von Allylnukleosid **75** (4.30 g, 5.30 mmol, 1.00 eq.) in Dioxan (200 mL) und Wasser (50 mL) wurden die folgenden Reagenzien beigemischt: 4-Methylmorpholin-*N*-oxid (1.86 g, 15.9 mmol, 3.00 eq.), OsO₄ (2.12 mL, 100 mg/mL, 14.1 mmol, 0.04 eq., Lösung in *t*-BuOH) gefolgt von einer Lösung von NaIO₄ (3.40 g, 15.9 mmol, 3.00 eq.) in Wasser (50 mL). Die Zugabe von mehr Wasser bewirkte das Ausfällen des Nukleosids. Die erhaltene weiße Suspension wurde für 18h bei 60°C gerührt, wobei sich die Lösung gegen Ende schwarz färbte. Die Reaktionsmischung wurde mit brine (100 mL) verdünnt und mit Dichlormethan (4 x 250 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreies MgSO₄ getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck eingedampft. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, Isohexan/EtOAc, 4:1→2:1→1:1→1:2) aufgereinigt und als farbloser Schaum erhalten (3.37 g, 4.37 mmol, 65 %).

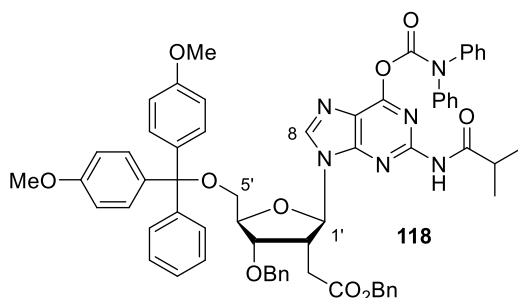
R_f 0.21 (Isohexan/EtOAc = 1:1)

¹H-NMR, COSY, NOESY (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.02 (bs, 1H, NH), 7.95 (s, 1H, H-8), 7.49 – 7.14 (m, 20H, aryl-H), 5.97 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H, H-1'), 4.90 (d, ²J = 12.2 Hz, 1H, COOCH₂Ph), 4.83 (d, ²J = 12.2 Hz, 1H, COOCH₂Ph), 4.58 (d, ²J = 11.5 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.57 – 4.53 (m, 1H, H-3'), 4.44 – 4.38 (m, 1H, H-4'), 4.43 (d, ²J = 11.5 Hz, 1H, OCH₂Ph), 3.99 – 3.92 (m, 1H, H_a-5'), 3.76 – 3.67 (m, 1H, H_b-5'), 3.63 – 3.53 (m, 1H, H-2'), 2.82 – 2.72 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2.80 (dd, ²J = 16.4 Hz, ³J = 8.0 Hz, 1H, CH₂COO), 2.46 (dd, ²J = 16.4 Hz, ³J = 6.7 Hz, 1H, CH₂COO), 1.25 (d, ³J = 2.7 Hz, 3H, CH(CH₃)₂), 1.24 (d, ³J = 2.7 Hz, 3H, CH(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 175.2 (CONH), 171.2 (C=O), 156.5 (OCONPh₂), 154.2 (C-4), 151.6 (C-6), 150.3 (C-2), 144.0 (C-8), 141.8 (OCON-Ph-C1), 137.5 (COOCH₂Ph-C-1), 135.5 (OCH₂Ph-C-1), 130.3, 129.3, 128.6, 128.4, 128.3, 128.1, 128.0 (aryl 20C), 122.7 (C-5), 90.6 (C-1'), 85.5 (C-4'), 80.1 (C-3'), 72.2 (OCH₂Ph), 66.7 (COOCH₂Ph), 63.4 (C-5'), 43.9 (C-

	2'), 36.4 (CH(CH ₃) ₂), 30.2 (CH ₂ COO), 19.40 (CH(CH ₃) ₂), 19.36 (CH(CH ₃) ₂) ppm.
IR	(ATR): $\tilde{\nu}$ = 3350, 2929, 1732, 1620, 1586, 1492, 1277, 1184, 1048, 698 cm ⁻¹ .
ESI-HRMS	m/z für [C ₄₃ H ₄₂ N ₆ O ₈ + H] ⁺ : berechnet: 771.3137 gefunden: 771.3136.

8.1.5. 9-[5-O(4,4'-Dimethoxytrityl)-3-O-benzyl-2,5-dideoxy-2-C-[(benzyloxycarbonyl)methylen]-β-D-ribofuranosyl]-6-O-(diphenylcarbamoyl)-2-N-isobutyrylguanin (118)



Alkoholnukleosid **99** (1.00 g, 1.30 mmol, 1.00 eq.) wurde in Pyridin (40 mL) gelöst und mit DMTrCl (0.53 g, 1.56 mmol, 1.20 eq.) versetzt. Die orange Lösung wurde unter Stickstoff für 18h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit MeOH (5 mL) gequencht und mit Toluol (2 x 50 mL) am Rotationsverdampfer coevaporiert. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, Isohexan/EtOAc, 4:1→2:1→1:1) aufgereinigt und als gelblicher Schaum erhalten (0.93 g, 0.87 mmol, 67 %).

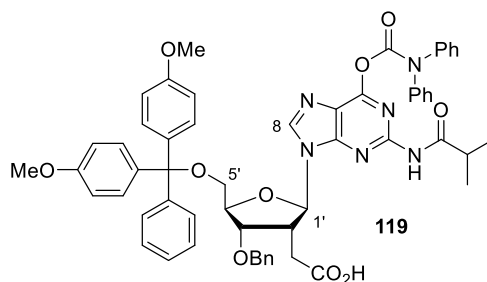
R_f 0.62 (Isohexan/EtOAc = 1:1)

¹H-NMR, COSY, NOESY (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.02 (s, 1H, H-8), 7.73 (bs, 1H, NH), 7.48 – 7.16 (m, 29H, aryl-H), 6.81 – 6.78 (m, 4H, MeO-aryl-H), 6.07 (d, ³J = 9.0 Hz, 1H, H-1'), 4.98 (d, ²J = 12.2 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.95 (d, ²J = 12.2 Hz, 1H, COOCH₂Ph), 4.51 (d, ²J = 11.5 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.41 – 4.39 (m, 1H, H-3'), 4.35 (d, ²J = 11.5 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.27 – 4.24 (m, 1H, H-4'), 3.763 (s, 3H, OCH₃), 3.761 (s, 3H, OCH₃), 3.43 – 3.37 (m, 1H, H-2'), 3.36 (dd, ²J = 10.4 Hz, ³J = 4.6 Hz, 1H, H_a-5'), 3.30 (dd, ²J = 10.4 Hz, ³J = 4.5 Hz, 1H, H_b-5'), 2.94 (dd, ²J = 17.0 Hz, ³J = 9.6 Hz, 1H, CH₂COO), 2.90 – 2.79 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2.50 (dd, ²J = 17.0 Hz, ³J = 5.2 Hz, 1H, CH₂COO), 1.18 (d, ³J = 6.9 Hz, 3H, CH(CH₃)₂), 1.15 (d, ³J = 6.9 Hz, 3H, CH(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 175.5 (CONH), 171.4 (C=O), 158.72 (OPh(MeO-C4-Ph)₂), 158.70 (OPh(MeO-C4-Ph)₂), 156.2 (OCONPh₂), 155.0 (C-4), 152.1 (C-6), 150.5 (C-2), 144.7 (OCON-Ph-C-1), 142.5 (C-8), 137.5 (COOCH₂Ph-C-1), 135.79 (OPh(MeO-Ph-C-1)₂), 135.74 (OPh(MeO-Ph-C-1)₂), 135.66 (OCH₂Ph-C-1), 130.20 (2x DMTr-C), 130.16 (2x DMTr-C), 129.3, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 128.08, 128.07, 128.02 (aryl 33C), 121.5 (C-5), 113.38 (2x DMTr-C), 113.37 (2x DMTr-C), 88.0 (C-1'), 83.8 (C-4'), 79.8 (C-3'), 72.0 (OCH₂Ph), 66.7 (COOCH₂Ph), 64.2 (C-5'), 55.4

	(OCH ₃), 44.7 (C-2'), 35.6 (CH(CH ₃) ₂), 29.6 (CH ₂ COO), 19.33 (CH(CH ₃) ₂), 19.30 (CH(CH ₃) ₂) ppm.	
IR	(ATR): $\tilde{\nu}$ = 3312, 2931, 2244, 1735, 1584, 1507, 1249, 1175, 1032, 698 cm ⁻¹ .	
ESI-HRMS	m/z für [C ₆₄ H ₆₀ N ₆ O ₁₀ + H] ⁺ :	berechnet: 1073.4444
		gefunden: 1073.4441.
	m/z für [C ₆₄ H ₆₀ N ₆ O ₁₀ + Na] ⁺ :	berechnet: 1095.4263
		gefunden: 1095.4269.
	m/z für [C ₆₄ H ₆₀ N ₆ O ₁₀ - H] ⁻ :	berechnet: 1071.4298
		gefunden: 1071.4301.

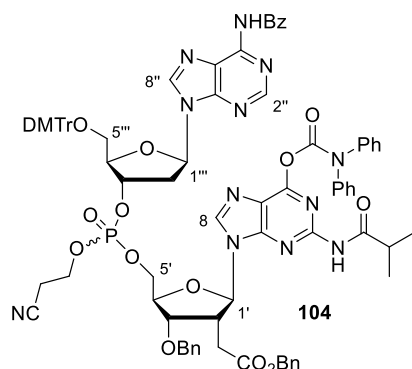
8.1.6. 9-[5-*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3-*O*-benzyl-2,5-dideoxy-2-*C*-carboxymethyl-β-D-ribofuranosyl]-6-*O*-(diphenylcarbamoyl)-2-*N*-isobutyrylguanin (119)



Benzylester **118** (1.00 g, 1.30 mmol, 1.00 eq.) wurde in Ethanol (80 mL) und THF (20 mL) gelöst und unter Stickstoff mit Pd/C (10wt. %, 0.20 g) angereichert. Die schwarze Suspension wurde anschließend dreimal mit Wasserstoff geflutet und evakuiert, um eine konsistente Wasserstoffatmosphäre unter Ausschluss von Sauerstoff (Brandgefahr!) zu erhalten. Die Reaktionsmischung wurde mit zwei Wasserstoffballons für 12h bei RT gerührt. Der Fortschritt der Reaktion wurde über Dünnschichtchromatographie und LCMS verfolgt. Es entstand zunehmend ein neuer Produktpot auf der Basislinie der DC-Platte, der sich nicht mit dem Laufmittel (Isohexan/EtOAc = 1:1) bewegte. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Ballons entfernt und die schwarze Suspension über Celite abfiltriert. Das Filtrat wurde *in vacuo* konzentriert und das Rohprodukt ohne weitere Aufreinigungsschritte im nächsten Kopplungsschritt verwendet.

ESI-HRMS	m/z für [C ₅₇ H ₅₄ N ₆ O ₁₀ + H] ⁺ :	berechnet: 983.3974
		gefunden: 983.3974.
	m/z für [C ₅₇ H ₅₄ N ₆ O ₁₀ + Na] ⁺ :	berechnet: 1005.3793
		gefunden: 1005.3795.
	m/z für [C ₅₇ H ₅₄ N ₆ O ₁₀ - H] ⁻ :	berechnet: 981.3828
		gefunden: 981.3833.

8.1.7. *N*6''-Benzoyl-2'''-deoxy-5'''-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-adenosin-3'''-5'-*O*,*O*-PO(OCE)-9-[3-*O*-benzyl-2,5-dideoxy-2-*C*-[(benzyloxycarbonyl)methylen]-β-D-ribofuranosyl]-6-*O*-(diphenylcarbamoyl)-2-*N*-isobutrylguanin (104)



G-Vorläufer **75** (0.70 g, 0.91 mmol, 1.00 eq.) und eine Verpackungseinheit von A-Phosphoramidit **102** (1.01 g, 1.18 mmol, 1.30 eq.) wurden in MeCN (15 mL) bei RT unter Stickstoff gelöst und nach 5 min mit einer Tetrazol-Lösung versetzt (3.63 mL, 0.45 M in MeCN, 1.64 mmol, 1.80 eq.). Die Reaktion wurde 2h bei RT gerührt und schließlich mit brauner Iodlösung (0.1M in THF/H₂O) oxidiert. Dabei entfärbt sich die Iodlösung und das Ende der Oxidation ist erreicht, sobald die Reaktionsmischung braun bleibt. Die Lösung wurde 30 min weitergerührt und anschließend *in vacuo* konzentriert. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, DCM/MeOH 0 %→1 %→2 %→3 %) aufgereinigt und als farbloser Schaum erhalten (1.21 g, 0.78 mmol, 66 %). Das Produkt ist ein Diastereomergemisch (D1/D2 = 1:1.1).

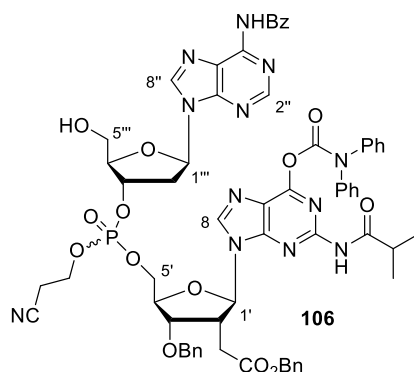
R_f 0.54 (DCM/MeOH = 100:5)

¹H-NMR, COSY, NOESY (400 MHz, CDCl₃, Hauptdiastereomer): δ = 8.74 (s, 1H, H-2''), 8.66 (bs, 1H, A-NH), 8.39 (bs, 1H, G-NH), 8.16 (s, 1H, H-8''), 8.07 (s, 1H, H-8), 8.03 – 7.98 (m, 2H, Bz-*o*-CH), 7.63 – 7.56 (m, 1H, Bz-*p*-CH), 7.54 – 7.48 (m, 2H, Bz-*m*-CH), 7.47 – 7.20 (m, 25H, aryl-H), 7.20 – 7.14 (m, 4H, MeO-aryl-*m*-CH), 6.85 – 6.80 (m, 4H, MeO-aryl-*o*-CH), 6.35 (dd, ³*J* = 9.4 Hz, ³*J* = 5.3 Hz, 1H, H-1'''), 6.03 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, H-1'), 5.20 – 5.15 (m, 1H, H-3'''), 4.94 (s, 2H, COOCH₂Ph), 4.62 (d, ²*J* = 11.7 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.55 – 4.52 (m, 1H, H-3'), 4.47 (d, ²*J* = 11.7 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.45 – 4.41 (m, 1H, H-4'''), 4.44 – 4.39 (m, 1H, H-4'), 4.42 – 4.36 (m, 2H, H-5'), 4.17 – 4.10 (m, 2H, OCH₂CH₂CN), 3.87 – 3.79 (m, 2H, H-5'''), 3.79 (s, 6H, 2x OCH₃), 3.64 – 3.54 (m, 1H, H-2'), 3.18 – 3.10 (m, 1H, H_a-2'''), 2.96 – 2.84 (m, 1H, CH₂COO), 2.90 – 2.76 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2.67 – 2.61 (m, 2H, OCH₂CH₂CN), 2.57 – 2.51 (m, 1H, H_b-2'''), 2.54 – 2.46 (m, 1H, CH₂COO), 1.24 (s, 3H, CH(CH₃)₂), 1.22 (s, 3H, CH(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CDCl₃, Hauptdiastereomer): δ = 175.4 (CONH), 171.5 (C=O), 164.6 (aryl-C(=O)NH), 158.8 (2x OPh(MeO-C4-Ph)₂), 156.4 (OCONPh₂), 154.6 (C-4), 152.4 (C2''), 152.2 (C-6), 150.8 (C4''), 150.6 (C-6''), 150.2 (C-2), 143.5 (C-8), 143.0 (C-8''), 141.8 (OCON-Ph-C1), 139.6 (2x OPh(MeO-Ph-C-1)₂), 137.1 (COOCH₂Ph-C-1), 135.50 (OCH₂Ph-C-1), 133.6 (aryl-C(=O)NH), 133.0 (Bz-*p*-CH), 129.7 (4x MeO-aryl-*m*-CH), 129.0 (2x Bz-*o*-CH), 128.0 (2x Bz-*m*-CH), 129.33, 129.06, 128.75, 128.71,

	128.5, 128.4, 128.1, 128.02, 127.97, 127.91, 127.2 (aryl 26C), 124.5 (C-5''), 122.3 (C-5), 116.6 (OCH ₂ CH ₂ CN), 113.3 (4x MeO-aryl- <i>o</i> -CH), 89.9 (C-1'), 87.8 (C-4'''), 86.8 (C-1'''), 82.5 (C-4'), 80.7 (d, C-3'''), 79.2 (C-3'), 72.5 (OCH ₂ Ph), 68.5 (d, C5'), 66.9 (COOCH ₂ Ph), 63.0 (C-5'''), 62.6 (d, OCH ₂ CH ₂ CN), 55.4 (2x OCH ₃), 43.0 (C-2'), 39.1 (C-2'''), 36.2 (CH(CH ₃) ₂), 29.9 (CH ₂ COO), 19.8 (d, OCH ₂ CH ₂ CN), 19.47 (CH(CH ₃) ₂), 19.37 (CH(CH ₃) ₂) ppm.
³¹ P-NMR	(162 MHz, CDCl ₃): δ = -2.7 ppm.
IR	(ATR): $\tilde{\nu}$ = 3271, 2932, 2249, 1732, 1584, 1508, 1248, 1176, 1028, 731 cm ⁻¹ .
ESI-HRMS	m/z für [C ₈₄ H ₇₉ N ₁₂ O ₁₆ P + H] ⁺ : berechnet: 1543.5548
	gefunden: 1543.5531.
	m/z für [C ₈₄ H ₇₉ N ₁₂ O ₁₆ P - H] ⁻ : berechnet: 1541.5402
	gefunden: 1541.5431.

8.1.8. N6''-Benzoyl-2'''-deoxy-adenosin-3'''-5'-O,O-PO(OCE)-9-{3-O-benzyl-2,5-dideoxy-2-C-[(benzyloxycarbonyl)methylen]-β-D-ribofuranosyl]-6-O-(diphenylcarbamoyl)-2-N-isobutyrylguanin (106)



Dinukleotid **104** (0.50 g, 0.32 mmol, 1.00 eq.) wurde bei RT in Dichlormethan (15 mL) gelöst und mit Wasser (1 mL) versetzt. Anschließend wurde zu der rührenden Lösung tropfenweise Dichloressigsäure (0.1 mL in 10 mL DCM) gegeben und die Reaktionsmischung färbte sich tiefrot. Nach 40 min Reaktionszeit wurde die Lösung mit Pyridin (5 mL) bis zur Farblosigkeit gequenchet und unter vermindertem Druck eingedampft. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, DCM/MeOH 0 % → 1 % → 2 % → 4 %) aufgereinigt und als farbloser Schaum erhalten (0.35 g, 0.28 mmol, 87 %). Das Produkt ist ein Diastereomergemisch (D1/D2 = 1:1.1).

<i>R_f</i>	0.28 (DCM/MeOH = 10:1)
¹ H-NMR, COSY, NOESY	(400 MHz, CDCl ₃ , Hauptdiastereomer): δ = 8.732 (s, 1H, H-2''), 8.726 (bs, 1H, A-NH), 8.46 (bs, 1H, G-NH), 8.19 (s, 1H, H-8''), 8.08 (s, 1H, H-8), 8.02 – 7.98 (m, 2H, Bz- <i>o</i> -CH), 7.62 – 7.57 (m, 1H, Bz- <i>p</i> -CH), 7.54 – 7.47 (m, 2H, Bz- <i>m</i> -CH), 7.37 – 7.18 (m, 20H, aryl-H), 6.35 (dd, ³ J = 9.4

Hz, $^3J = 5.3$ Hz, 1H, H-1'''), 6.01 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 1H, H-1'), 5.21 – 5.15 (m, 1H, H-3'''), 4.95 (s, 2H, COOCH₂Ph), 4.63 (d, $^2J = 11.5$ Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.55 – 4.51 (m, 1H, H-3'), 4.49 (d, $^2J = 11.5$ Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.45 – 4.41 (m, 1H, H-4'''), 4.44 – 4.39 (m, 1H, H-4'), 4.42 – 4.37 (m, 2H, H-5'), 4.19 – 4.10 (m, 2H, OCH₂CH₂CN), 3.87 – 3.79 (m, 2H, H-5'''), 3.64 – 3.53 (m, 1H, H-2'), 3.18 – 3.09 (m, 1H, H_a-2'''), 2.96 – 2.84 (m, 1H, CH₂COO), 2.90 – 2.75 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2.67 – 2.61 (m, 2H, OCH₂CH₂CN), 2.57 – 2.51 (m, 1H, H_b-2'''), 2.54 – 2.46 (m, 1H, CH₂COO), 1.24 (s, 3H, CH(CH₃)₂), 1.22 (s, 3H, CH(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC

(100.6 MHz, CDCl₃, Hauptdiastereomer): δ = 175.5 (CONH), 171.5 (C=O), 164.7 (aryl-CCONH), 156.4 (OCONPh₂), 154.4 (C-4), 152.3 (C2''), 152.2 (C-6), 150.8 (C4''), 150.6 (C-6''), 150.3 (C-2), 144.0 (C-8), 143.1 (C-8''), 141.8 (OCON-Ph-C1), 137.2 (COOCH₂Ph-C-1), 135.5 (OCH₂Ph-C-1), 133.6 (aryl-CCONH), 133.0 (Bz-*p*-CH), 129.0 (2x Bz-*o*-CH), 128.0 (2x Bz-*m*-CH), 129.30, 129.25, 129.0, 128.72, 128.69, 128.5, 128.3, 128.1, 128.0 (aryl 20C), 124.4 (C-5''), 122.2 (C-5), 116.6 (OCH₂CH₂CN), 89.8 (C-1'), 87.7 (C-4'''), 86.8 (C-1'''), 82.4 (C-4'), 80.7 (d, C-3'''), 79.2 (C-3'), 72.2 (OCH₂Ph), 68.3 (d, C5'), 66.8 (COOCH₂Ph), 63.1 (C-5'''), 62.6 (d, OCH₂CH₂CN), 43.0 (C-2'), 39.1 (C-2'''), 36.2 (CH(CH₃)₂), 29.9 (CH₂COO), 19.8 (d, OCH₂CH₂CN), 19.45 (CH(CH₃)₂), 19.37 (CH(CH₃)₂) ppm.

³¹P-NMR

(162 MHz, CDCl₃): δ = -2.1 – -3.1 (m) ppm.

IR

(ATR): $\tilde{\nu}$ = 3254, 2971, 2249, 1730, 1584, 1491, 1255, 1184, 1002, 693 cm⁻¹.

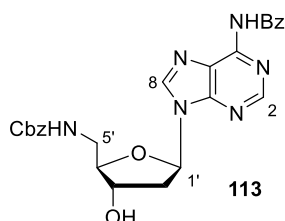
ESI-HRMS

m/z für [C₆₃H₆₁N₁₂O₁₄P + H]⁺: berechnet: 1241.4241

gefunden: 1241.4231.

m/z für [C₆₃H₆₁N₁₂O₁₄P - H]⁻: berechnet: 1239.4095

gefunden: 1239.4081.

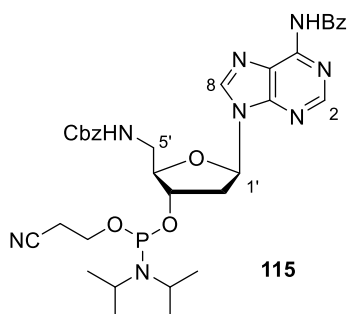
8.1.9. N6-Benzoyl-5'-Benzyloxycarbonylamino-2'-deoxyadenosin (113)

Die Reaktionsbeschreibung der Titelverbindung richtete sich nach einer modifizierten Vorschrift von Patil et al.^[186] Die Aminoverbindung^[170] **113E** (0.80 g, 2.26 mmol, 1.00 eq.) wurde in einem Dioxan/H₂O-Gemisch (4:1, 50 mL) bei RT gelöst und mit festem NaHCO₃ (1.14 g, 13.5 mmol, 6.00 eq.) vermengt. Die Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und unter Rühren mit Benzyloxycarbonylchlorid (CbzCl, 0.47 mL, 0.58 g, 3.39 mmol, 1.50 eq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 12h bei RT gerührt und anschließend auf ein Viertel des Volumens eingengt. Die Lösung wurde mit brine (30 mL) verdünnt

und mit Dichlormethan (4 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreies MgSO₄ getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck eingedampft. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, DCM/MeOH, 0 % → 2 % → 5 % → 10 %) aufgereinigt und als farbloser Schaum erhalten (0.72 g, 1.47 mmol, 65 %).

R_f	0.26 (DCM/MeOH = 10:1)
¹H-NMR, COSY, NOESY	(400 MHz, CDCl ₃): δ = 9.05 (bs, 1H, A-NH), 8.29 (s, 1H, H-2''), 7.83 (s, 1H, H-8''), 8.04 – 7.97 (m, 2H, Bz- <i>o</i> -CH), 7.99 – 7.93 (m, 2H, Bn- <i>o</i> -CH), 7.60 – 7.53 (m, 1H, Bz- <i>p</i> -CH), 7.54 – 7.47 (m, 2H, Bz- <i>m</i> -CH), 7.43 – 7.38 (m, 1H, Bn- <i>p</i> -CH), 7.39 – 7.34 (m, 2H, Bn- <i>m</i> -CH), 6.03 (dd, ³ J = 9.6 Hz, ³ J = 3.9 Hz, 1H, H-1'), 5.19 (d, ² J = 12.5 Hz, 1H, CONHCH ₂ Ph), 5.12 (d, ² J = 12.5 Hz, 1H, CONHCH ₂ Ph), 4.75 (dd, ² J = 12.0 Hz, ³ J = 3.5 Hz, 1H, H _a -5'), 4.75 – 4.70 (m, 1H, H-3'), 4.53 (dd, ² J = 12.0 Hz, ³ J = 7.1 Hz, 1H, H _b -5'), 4.35 – 4.29 (m, 1H, H-4'), 3.01 (dd, ³ J = 9.6 Hz, ² J = 6.1 Hz, 1H, H _a -2'), 2.57 (dd, ³ J = 9.6 Hz, ² J = 3.9 Hz, 1H, H _b -2') ppm.
¹³C-NMR, HSQC, HMBC	(100.6 MHz, CDCl ₃): δ = 166.4 (aryl-C(=O)NH), 156.7 (CONHCH ₂ Ph), 156.0 (C-6), 152.5 (C-2), 148.2 (C4), 141.2 (C-8), 136.9 (CONHCH ₂ Ph-C-1), 133.5 (aryl-C(=O)NH), 133.2 (Bz- <i>p</i> -CH), 129.9 (2x Bz- <i>o</i> -CH), 128.7 (2x Bn- <i>o</i> -CH), 128.6 (2x Bz- <i>m</i> -CH), 128.4 (2x Bn- <i>m</i> -CH), 127.6 (Bn- <i>p</i> -CH), 121.1 (C-5), 84.9 (C-1'), 80.8 (C-4'), 66.7 (CONHCH ₂ Ph), 63.5 (C-5'), 51.7 (C-3'), 38.2 (C-2'') ppm.
IR	(ATR): $\tilde{\nu}$ = 3254, 2971, 2249, 1730, 1584, 1491, 1255, 1184, 1002, 693 cm ⁻¹ .
ESI-HRMS	m/z für [C ₂₅ H ₂₄ N ₆ O ₅ + Na] ⁺ : berechnet: 511.1700 gefunden: 511.1706.
	m/z für [C ₂₅ H ₂₄ N ₆ O ₅ - H] ⁻ : berechnet: 487.1735 gefunden: 487.1745.

8.1.10. N6-Benzoyl-5'-Benzyloxycarbonylamino-2'-deoxyadenosin-3'-O-[O-(2-cyanoethyl)-N,N'-diisopropylphosphoramidit] (**115**)



Das Cbz-geschützte A-Nukleosid **113** (0.80 g, 2.26 mmol, 1.00 eq.) wurde in Dichlormethan (20 mL) bei RT unter Argon gelöst und auf 0°C abgekühlt. In die Lösung wurden nacheinander Diisopropylethylamin (DIPEA, 0.70 mL, 0.53 g, 4.10 mmol, 4.00 eq.) und Cyanoethyl N,N-diisopropylchlorophosphoramidit

(CEDCI **114**, 0.46 mL, 0.48 g, 2.05 mmol, 2.00 eq.) gegeben und die resultierende gelbe Reaktionsmischung für 1h gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde über Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wurde eine wässrige gesättigte NaHCO₃-Lösung (10 mL) zugefügt und die Mischung mit Dichlormethan (2 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreies MgSO₄ getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck eingedampft. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silica Gel + 0.1 % Triethylamin, Isohexan/EtOAc (peroxdifrei), Hex→2:1→1:1) aufgereinigt und als farbloser Schaum erhalten (0.52 g, 0.76 mmol, 74 %). Die Verbindung wurde ohne NMR-Charakterisierung direkt im nächsten Kopplungsschritt weiterverwendet.

ESI-HRMS

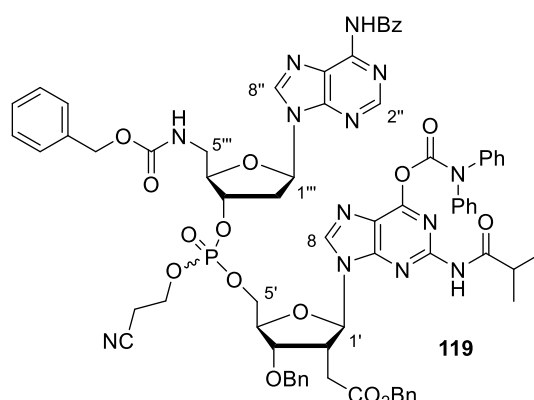
m/z für [C₃₄H₄₁N₈O₆P + Na]⁺: berechnet: 711.2779

gefunden: 711.2777.

m/z für [C₃₄H₄₁N₈O₆P - H]⁻: berechnet: 687.2814

gefunden: 687.2828.

8.1.11. N6''-Benzoyl-5'''-Benzyloxycarbonylamino-2'''-deoxyadenosin-3'''-5'-O,O-PO(OCE)-9-[3-O-benzyl-2,5-dideoxy-2-C-[(benzyloxycarbonyl)methylen]-β-D-ribofuranosyl]-6-O-(diphenylcarbamoyl)-2-N-isobutyrylguanin (119**)**



A-Phosphoramidit **115** (0.40 g, 0.58 mmol, 1.00 eq.) und G-Vorläufer **99** (0.49 g, 0.64 mmol, 1.10 eq.) wurden in MeCN (10 mL) bei RT unter Stickstoff gelöst und nach 5 min mit einer Tetrazol-Lösung versetzt (2.32 mL, 0.45 M in MeCN, 1.05 mmol, 1.80 eq.). Die Reaktion wurde 2h bei RT gerührt und schließlich mit brauner Iodlösung (0.1M in THF/H₂O) oxidiert. Dabei entfärbt sich die Iodlösung und das Ende der Oxidation ist erreicht, sobald die Reaktionsmischung braun bleibt. Die Lösung wurde 30 min weitergerührt und anschließend *in vacuo* konzentriert. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, DCM/MeOH 0 %→1 %→2 %→3 %) aufgereinigt und als farbloser Schaum erhalten (0.50 g, 0.36 mmol, 57 %). Das Produkt ist ein Diastereomengemisch (D1/D2 = 1:1.1).

R_f

0.65 (DCM/MeOH = 10:1)

¹H-NMR, COSY, NOESY

(400 MHz, CDCl₃, Hauptdiastereomer): δ = 9.05 (bs, 1H, A-NH), 8.71 (s, 1H, H-2''), 8.62 (bs, 1H, G-NH), 8.09 (s, 1H, H-8''), 8.03 (s, 1H, H-8), 8.02 – 7.98 (m, 2H, Bz-*o*-CH), 7.63 – 7.58 (m, 1H, Bz-*p*-CH), 7.54 – 7.49 (m,

2H, Bz-*m*-CH), 7.49 – 7.18 (m, 25H, aryl-H), 6.35 (dd, $^3J = 9.0$ Hz, $^3J = 5.6$ Hz, 1H, H-1'''), 6.02 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, H-1'), 5.18 – 5.09 (m, 1H, H-3'''), 5.16 (d, $^2J = 12.4$ Hz, 1H, CONHCH₂Ph), 5.11 (d, $^2J = 12.4$ Hz, 1H, CONHCH₂Ph), 4.93 (s, 2H, COOCH₂Ph), 4.63 (d, $^2J = 11.5$ Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.60 – 4.54 (m, 1H, H-3'), 4.49 (d, $^2J = 11.5$ Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.46 – 4.42 (m, 1H, H-4'''), 4.44 – 4.39 (m, 1H, H-4'), 4.42 – 4.35 (m, 2H, H-5'), 4.18 – 4.08 (m, 2H, OCH₂CH₂CN), 3.86 – 3.80 (m, 1H, H_a-5'''), 3.74 – 3.69 (m, 1H, H_a-2'''), 3.65 – 3.58 (m, 1H, H-2'), 3.45 – 3.39 (m, 1H, H_b-5'''), 3.38 – 3.31 (m, 1H, H_b-2'''), 2.94 – 2.84 (m, 1H, CH₂COO), 2.88 – 2.78 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2.69 – 2.61 (m, 2H, OCH₂CH₂CN), 2.57 – 2.45 (m, 1H, CH₂COO), 1.25 (s, 3H, CH(CH₃)₂), 1.22 (s, 3H, CH(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC

(100.6 MHz, CDCl₃, Hauptdiastereomer): δ = 175.4 (CONH), 171.4 (C=O), 164.6 (aryl-CCONH), 157.4 (CONHCH₂Ph), 156.4 (OCONPh₂), 154.5 (C-4), 152.4 (C-2''), 152.3 (C-6), 151.1 (C4''), 150.7 (C-6''), 150.3 (C-2), 144.0 (C-8), 143.6 (C-8''), 141.8 (OCON-Ph-C1), 137.1 (COOCH₂Ph-C-1), 136.8 (CONHCH₂Ph-C-1), 135.5 (OCH₂Ph-C-1), 133.6 (aryl-CCONH), 133.0 (Bz-*p*-CH), 129.0 (2x Bz-*o*-CH), 128.0 (2x Bz-*m*-CH), 129.30, 129.25, 129.0, 128.71, 128.69, 128.63, 128.5, 128.3, 128.1, 128.0 (aryl 25C), 124.4 (C-5''), 122.2 (C-5), 116.7 (OCH₂CH₂CN), 89.8 (C-1'), 86.3 (C-1'''), 85.0 (C-4'''), 82.3 (C-4'), 79.9 (d, C-3'''), 79.2 (C-3'), 72.5 (OCH₂Ph), 68.5 (d, C5'), 67.0 (CONHCH₂Ph), 66.8 (COOCH₂Ph), 62.6 (d, OCH₂CH₂CN), 43.0 (C-2'), 42.9 (C-5'''), 42.7 (C-2'''), 36.2 (CH(CH₃)₂), 30.0 (CH₂COO), 19.7 (d, OCH₂CH₂CN), 19.46 (CH(CH₃)₂), 19.41 (CH(CH₃)₂) ppm.

³¹P-NMR

(162 MHz, CDCl₃): δ = -2.4 – -2.9 (m) ppm.

IR

(ATR): $\tilde{\nu}$ = 3263, 2922, 2244, 1725, 1584, 1491, 1249, 1185, 1027, 698 cm⁻¹.

ESI-HRMS

m/z für [C₇₁H₆₈N₁₃O₁₅P + Na]⁺: berechnet: 1396.4587

gefunden: 1396.4585.

m/z für [C₇₁H₆₈N₁₃O₁₅P - H]⁻: berechnet: 1372.4622

gefunden: 1372.4641.

8.2. Synthese des amid- und triazolverknüpften Analogons 2'^{AL}3'^{TL}-cGAMP

Die Arbeiten zu einem neutral geladenem 2'3'-cGAMP-Analogen wurden bereits veröffentlicht:

A Click-Chemistry Linked 2'3'-cGAMP Analogue

Clemens Reto Dialer, Samuele Stazzoni, David Jan Drexler, Felix Moritz Müller, Simon Veth, Alexander Pichler, Hidenori Okamura, Gregor Witte, Karl-Peter Hopfner, Thomas Carell*
Chem. Eur. J. **2019**, 25, 2089-2095.

Die Vorschriften der Reaktionen, NMR- und Kristallstrukturen sind online in der *Supporting Information* der Publikation verfügbar:

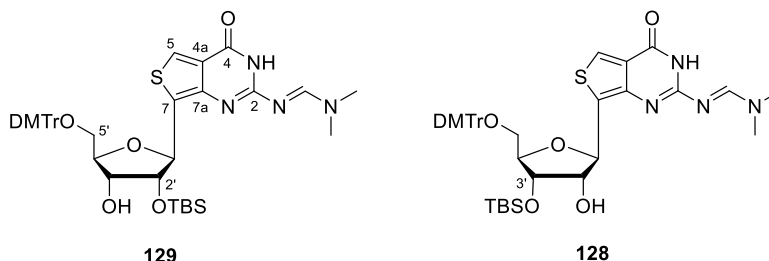
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/chem.201805409>

Anmerkung:

Die Glykosylierung von Verbindung **21** (aus der Publikation) konnte neben dpc/iBu-geschütztem Guanin auch mit Benzoyl-geschütztem Adenin erfolgreich durchgeführt werden (β -selektiv, 70% Ausbeute). Die β -Selektivität und guten Ausbeuten der Purin-Glykosylierungen konnten nicht mit den Pyrimidin-Nukleobasen Bz-Cytosin und Uracil reproduziert werden.

8.3. Synthese von 2'3'-TorGAMP und 3'3'-TorGAMP

8.3.1. 5'-O-DMTr-*N*²-DMF-2'-O-TBS-thguanosin (**129**) und 5'-O-DMTr-*N*²-DMF-3'-O-TBS-thguanosin (**128**)



Die Vorläuferverbindung 5'-O-DMTr-*N*²-DMF-thguanosin (**127**) wurde über sechs konsekutive Schritte im 8 g Maßstab nach einer Vorschrift von Shin et al.^[150] synthetisiert.

Zu einer Lösung von Verbindung **127** (4.60 g, 7.00 mmol, 1.00 eq.) in Pyridin (125 mL) wurde festes Imidazol (0.95 g, 14.1 mmol, 1.00 eq.) und *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (1.06 g, 7.00 mmol, 1.00 eq.) unter Stickstoff gegeben. Die Lösung wurde bei RT gerührt. Nach 3 h wurde eine zweite Portion *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (0.53 g, 3.50 mmol, 0.50 eq.) beigemengt und für weitere 12 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktion mit Methanol (15 mL) gequencht, alle flüchtigen Komponenten *in vacuo* entfernt und der Rückstand mit Toluol (2 x 100 mL) coevaporiert. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, Isohexan/EtOAc, 4:1→2:1→1:1→1:3→1:4→EtOAc) aufgereinigt und als farbloser Schaum erhalten. Das Produkt enthielt ein Gemisch aus 2'-O-TBS Verbindung **129** (2.05 g, 2.66 mmol, 38 %) und 3'-O-TBS Verbindung **128** (1.79 g, 2.32 mmol, 33 %). Diese Mischung wurde für die nachfolgenden Reaktionen ohne weitere Trennung verwendet (bis zur letzten präparativen RP-HPLC der finalen Produkte 3'3'-TorGAMP und 2'3'-TorGAMP). Außerdem wurden geringe Mengen an doppelt TBS-geschütztem Nukleosid (290 mg, 0.33 mmol, 5 %) isoliert.

Analytische Proben beider Verbindungen **129** und **128** wurden durch präparative RP-HPLC gewonnen. Dafür wurde das Produktgemisch (50 mg Portion) nach der Säulenchromatographie in 80 % MeCN (5 mL) gelöst.

Präparative RP-HPLC (flow rate: 5 mL/min), isokratische Elution mit 80 % MeCN:

T / min	0	30
A (H ₂ O) / %	20	20
B (MeCN) / %	80	80

Produktfraktionen wurden jeweils von 11.4 – 14.2 min für 2'-O-TBS und 16.0 – 19.4 min für 3'-O-TBS gesammelt. Die Lösemittel wurden evaporiert und über Nacht lyophilisiert, um einen farblosen Feststoff preiszugeben.

Verbindung **129** (2'-O-TBS)

7-[5'-O-Dimethoxytrityl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-β-D-ribofuranosyl]-*N*²-[(dimethylamino)methylen]-2-aminothieno[3,4-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-on

*R*_f 0.58 (DCM/MeOH, 10:1)

¹H-NMR, COSY, NOESY zusätzlich: ¹H-²⁹Si-HMBC (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.68 (s, 1H, H-dmf), 8.66 (s, 1H, NH), 8.16 (s, 1H, H-5), 7.55 – 7.51 (m, 2H, Ph-*o*-CH), 7.44 –

	7.38 (m, 4H, MeO-Ph- <i>o</i> -CH), 7.30 – 7.25 (m, 2H, Ph- <i>m</i> -CH), 7.23 – 7.17 (m, 1H, Ph- <i>p</i> -CH), 6.84 – 6.80 (m, 4H, MeO-Ph- <i>m</i> -CH), 5.63 (d, $^3J = 6.9$ Hz, 1H, H-1'), 4.45 (dd, $^3J = 6.9$ Hz, $^3J = 4.9$ Hz, 1H, H-2'), 4.18 – 4.15 (m, 1H, H-4'), 4.16 – 4.14 (m, 1H, H-3'), 3.784 (s, 3H, OCH ₃), 3.780 (s, 3H, OCH ₃), 3.50 (dd, $^2J = 10.2$ Hz, $^3J = 2.5$ Hz, 1H, H _a -5'), 3.19 (dd, $^2J = 10.2$ Hz, $^3J = 3.5$ Hz, 1H, H _b -5'), 3.13 (s, 3H, CH ₃ -dmf), 3.08 (s, 3H, CH ₃ -dmf), 2.88 (d, $^3J = 3.1$ Hz, 1H, OH-3'), 0.83 (s, 9H, SiC(CH ₃) ₃), -0.03 (s, 3H, Si(CH ₃) ₂), -0.16 (s, 3H, Si(CH ₃) ₂) ppm.
¹³C-NMR, HSQC, HMBC	(100.6 MHz, CDCl ₃): $\delta = 159.7$ (C-4), 158.54 (MeO-C-Ph), 158.52 (MeO-C-Ph), 157.9 (CH-dmf), 153.8 (C-2), 147.9 (C-7a), 145.1 (Ph-CC), 136.31 (MeO-Ph-CC), 136.11 (MeO-Ph-CC), 130.30 (2x MeO-Ph- <i>o</i> -CH), 130.26 (2x MeO-Ph- <i>o</i> -CH), 128.9 (C-7), 128.4 (2x Ph- <i>o</i> -CH), 127.9 (2x Ph- <i>m</i> -CH), 126.8 (Ph- <i>p</i> -CH), 125.9 (C-5), 125.4 (C-4a), 113.23 (2x MeO-Ph- <i>m</i> -CH), 113.21 (2x MeO-Ph- <i>m</i> -CH), 86.2 (CPh(Ph-OMe) ₂), 84.0 (C-4'), 79.6 (C-2'), 77.0 (C-1'), 73.0 (C-3'), 64.3 (C-5'), 55.3 (2x OCH ₃), 41.3 (CH ₃ -dmf), 35.1 (CH ₃ -dmf), 25.8 (SiC(CH ₃) ₃), 18.1 (SiC(CH ₃) ₃), -4.8 (Si(CH ₃) ₂), -5.1 (Si(CH ₃) ₂) ppm.
²⁹Si-NMR	(80 MHz, CDCl ₃): $\delta = 23.5$ ppm.
IR	(ATR): $\tilde{\nu} = 2929, 2248, 1679, 1629, 1572, 1508, 1250, 1112, 835, 729$ cm ⁻¹ .
ESI-HRMS	m/z für [C ₄₁ H ₅₀ N ₄ O ₇ SSi + H] ⁺ : berechnet: 771.3242 gefunden: 771.3243. m/z für [C ₄₁ H ₅₀ N ₄ O ₇ SSi - H] ⁻ : berechnet: 769.3096 gefunden: 769.3105.

Verbindung 128 (3'-O-TBS)

7-[5'-O-Dimethoxytrityl-3'-O-(tert-butyldimethylsilyl)- β -D-ribofuranosyl]-N2-[(dimethylamino)methylen]-2-aminothieno[3,4-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-on

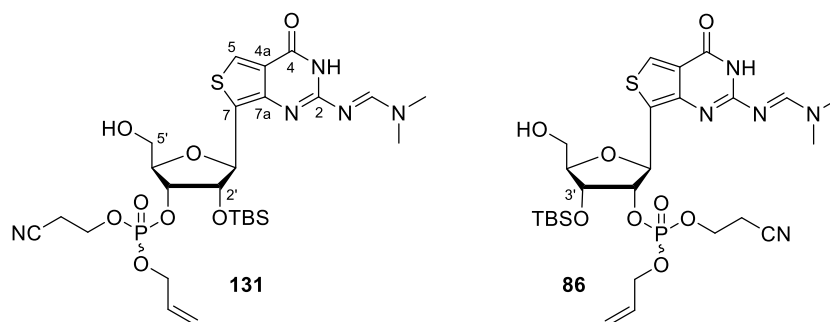
R_f 0.55 (DCM/MeOH, 10:1)

¹H-NMR, COSY, NOESY zusätzlich: **¹H-²⁹Si-HMBC** (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 9.03$ (s, 1H, NH), 8.61 (s, 1H, H-dmf), 8.12 (s, 1H, H-5), 7.52 – 7.47 (m, 2H, Ph-*o*-CH), 7.41 – 7.35 (m, 4H, MeO-Ph-*o*-CH), 7.29 – 7.24 (m, 2H, Ph-*m*-CH), 7.22 – 7.17 (m, 1H, Ph-*p*-CH), 6.83 – 6.79 (m, 4H, MeO-Ph-*m*-CH), 5.53 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 1H, H-1'), 4.31 (dd, $^3J = 5.3$ Hz, $^3J = 3.3$ Hz, 1H, H-3'), 4.24 (dd, $^3J = 7.0$ Hz, $^3J = 5.3$ Hz, 1H, H-2'), 4.11 (dd, $^3J = 6.9$ Hz, $^3J = 3.3$ Hz, 1H, H-4'), 3.775 (s, 3H, OCH₃), 3.773 (s, 3H, OCH₃), 3.42 (dd, $^2J = 10.3$ Hz, $^3J = 3.4$ Hz, 1H, H_a-5'), 3.14 (dd, $^2J = 10.3$ Hz, $^3J = 3.9$ Hz, 1H, H_b-5'), 3.12 (s, 3H, CH₃-dmf), 3.05 (s, 3H, CH₃-dmf), 0.88 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.06 (s, 3H, Si(CH₃)₂), -0.02 (s, 3H, Si(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CDCl₃): $\delta = 159.7$ (C-4), 158.50 (MeO-C-Ph), 158.49 (MeO-C-Ph), 157.8 (CH-dmf), 154.1 (C-2), 146.3 (C-7a), 144.9 (Ph-CC), 136.2 (MeO-Ph-CC), 136.0 (MeO-Ph-CC), 130.2 (4x MeO-Ph-*o*-CH), 129.5 (C-

	7), 128.3 (2x Ph- <i>o</i> -CH), 127.9 (2x Ph- <i>m</i> -CH), 126.8 (Ph- <i>p</i> -CH), 125.4 (C-4a), 125.1 (C-5), 113.19 (2x MeO-Ph- <i>m</i> -CH), 113.18 (2x MeO-Ph- <i>m</i> -CH), 86.2 (CPh(Ph-OMe) ₂), 84.0 (C-4'), 78.3 (C-1'), 77.8 (C-2'), 73.7 (C-3'), 63.5 (C-5'), 55.3 (2x OCH ₃), 41.3 (CH ₃ -dmf), 35.1 (CH ₃ -dmf), 25.9 (SiC(CH ₃) ₃), 18.3 (SiC(CH ₃) ₃), -4.5 (Si(CH ₃) ₂), -4.6 (Si(CH ₃) ₂) ppm.
²⁹ Si-NMR	(80 MHz, CDCl ₃): δ = 22.3 ppm.
IR	(ATR): $\tilde{\nu}$ = 2930, 2247, 1680, 1629, 1572, 1508, 1258, 1111, 832, 725 cm ⁻¹ .
ESI-HRMS	m/z für [C ₄₁ H ₅₀ N ₄ O ₇ SSi + H] ⁺ : berechnet: 771.3242 gefunden: 771.3239. m/z für [C ₄₁ H ₅₀ N ₄ O ₇ SSi - H] ⁻ : berechnet: 769.3096 gefunden: 769.3107.

8.3.2. N²-DMF-3'-O-PO(OallylOCE)-2'-O-TBS-thguanosin (131) und N²-DMF-2'-O-PO(OallylOCE)-3'-O-TBS-thguanosin (86)



Die Synthese der Titelverbindungen folgte dem Allylkonzept von Ching et al.^[179] die Verbindungen **128** und **129** (2.30 g, 2.98 mmol, 1.00 eq.) wurden in trockenem DCM DCM (23.1 mL) gelöst. Unter Rühren wurde 2-Cyanoethyl *N,N,N',N'*-Tetraisopropylphosphoroamidit (1.14 mL, 3.58 mmol, 1.20 eq.) hinzuge tropft und die klare Lösung wurde unter Argon bei RT für 10 min gerührt. Pyridinium Trifluoroacetat (691 mg, 3.58 mmol, 1.20 eq.) wurde zugegeben und die Reaktionsmischung wurde unter Argon bei RT für 3 h gerührt. Der Reaktionsumsatz wurde mittels DC verfolgt. Nach vollendeter Reaktion wurde die Lösung mit Allylalkohol (1.01 mL, 14.9 mmol, 5.00 eq.) und BTT Aktivator (0.3 m solution in MeCN, 19.9 mL, 5.96 mmol, 2.00 eq.) versetzt und für weitere 90 min unter Argon und RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 m in decane, 1.60 mL, 8.94 mmol, 3.00 eq.) oxidiert und die Mischung für 30 min bei RT gerührt. Nach Kühlung auf 0 °C wurde die Reaktion durch wässrige gesättigte NaHSO₃-Lösung (500 mg/mL, 3.74 mL, 17.8 mmol, 6.00 eq.) gequenchet, nach weiteren 5 min mit EtOAc (100 mL) verdünnt und schließlich mit brine (100 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 × 50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Bestandteile über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und *in vacuo* konzentriert. Der Rückstand wurde in DCM (48.0 mL) und H₂O (0.54 mL) gelöst und bei RT gerührt. Durch Zugabe von Dichloressigsäure (6 % v/v in DCM, 48.0 mL) erfolgte ein Farbumschlag von gelb nach tiefrot und die Lösung wurde für 15 min bei RT gerührt. Nach vollständiger DMTr-Entschützung wurde wässrige gesättigte NaHCO₃-Lösung (200 mL) beigemischt und die resultierende gelbe Suspension mit

EtOAc (500 mL) und H₂O (200 mL) verdünnt. Die beiden Phasen wurden voneinander getrennt und der wässrige Teil wurde mit weiterem EtOAc (2 × 300 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und *in vacuo* konzentriert. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, DCM/MeOH, 49:1 → 19:1) aufgereinigt und als gelber Schaum erhalten. Das isolierte Produkt enthielt eine Mischung aus 4 isomeren Verbindungen, 2 Diastereomere von Molekül **131** und 2 Diastereomere von Molekül **86** (1.32 g, 2.06 mmol, 69 %, untrennbar durch fcc).

N²-DMF-3'-O-PO(OallylOCE)-2'-O-TBS-thguanosin (131)

oder

7-[3'-O-[Allyloxy(2''-cyanoethoxy)phosphoryl]-2'-O-(tert-butyldimethylsilyl)-β-D-ribofuranosyl]-N2-[(dimethylamino)methylene]-2-aminothieno[3,4-d]pyrimidin-4(3H)-on (131)

Analytische Proben von **131-25min** und **131-27min** wurden über RP-HPLC gewonnen. Dafür wurde das Produktgemisch nach der Säulenchromatographie in 30 % MeCN gelöst.

Präparative RP-HPLC (flow rate: 5 mL/min)

T / min	0	45	48	55	58	60
A (H ₂ O) / %	70	40	20	20	70	70
B (MeCN) / %	30	60	80	80	30	30

Produktfraktionen wurden jeweils von 24.5 – 26.0 min für **131-25min** und 26.4 – 28.8 min für **131-27min** gesammelt. Die Lösemittel wurden evaporiert und über Nacht lyophilisiert, um einen farblosen Feststoff zu erhalten.

Diastereomer 1: 131-25min – 2'-O-TBS

R_f 0.41 (DCM/MeOH, 10:1). 0.27 (DCM/MeOH, 19:1).

R_t 5.97 min (RP-LCMS, 5 % to 80 % MeCN gradient elution, 8 min run).

¹H-NMR, COSY, NOESY zusätzlich: **¹H-²⁹Si-HMBC, ¹H-³¹P-HMBC** (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.99 (s, 1H, NH), 8.39 (s, 1H, H-dmf), 8.09 (s, 1H, H-5), 6.03 – 5.91 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 5.56 (bs, 1H, OH-5'), 5.44 – 5.37 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 5.32 – 5.28 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 5.09 – 5.03 (m, 1H, H-2'), 4.95 – 4.91 (m, 1H, H-3'), 4.93 (d, ³J = 8.8 Hz, 1H, H-1'), 4.65 – 4.58 (m, 2H, OCH₂CH=CH₂), 4.40 – 4.36 (m, 1H, H-4'), 4.34 – 4.26 (m, 2H, OCH₂CH₂CN), 3.84 (dd, ²J = 12.5 Hz, ³J = 2.3 Hz, 1H, H_a-5'), 3.71 (d, ²J = 12.5 Hz, 1H, H_b-5'), 3.15 (s, 3H, CH₃-dmf), 3.07 (s, 3H, CH₃-dmf), 2.81 – 2.76 (m, 2H, OCH₂CH₂CN), 0.75 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), -0.16 (s, 3H, Si(CH₃)₂), -0.28 (s, 3H, Si(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 159.4 (C-4), 158.1 (CH-dmf), 155.3 (C-2), 146.4 (C-7a), 132.1 (d, OCH₂CH=CH₂), 126.3 (C-4a), 125.4 (C-5), 124.5 (C-7), 119.1 (OCH₂CH=CH₂), 116.4 (OCH₂CH₂CN), 85.0 (d, C-4'), 80.7 (d, C-3'), 79.1 (C-1'), 75.1 (d, C-2'), 69.0 (d, OCH₂CH=CH₂), 63.0 (C-5'), 62.1 (d, OCH₂CH₂CN), 41.2 (CH₃-dmf), 35.1 (CH₃-dmf), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 19.7 (d, OCH₂CH₂CN), 18.2 (SiC(CH₃)₃), -5.0 (Si(CH₃)₂), -5.3 (Si(CH₃)₂) ppm.

²⁹Si-NMR (80 MHz, CDCl₃): δ = 23.0 ppm.

³¹P-NMR	(162 MHz, CDCl ₃): δ = -1.5 – -1.8 (m) ppm.
IR	(ATR): $\tilde{\nu}$ = 3191, 2929, 1681, 1630, 1565, 1463, 1421, 1257, 1022, 726 cm ⁻¹ .
ESI-LRMS	m/z für [C ₂₆ H ₄₀ N ₅ O ₈ PSSi + H] ⁺ : berechnet: 642.2 gefunden: 642.4.
ESI-HRMS	m/z für [C ₂₆ H ₄₀ N ₅ O ₈ PSSi + H] ⁺ : berechnet: 642.2177 gefunden: 642.2180. m/z für [C ₂₆ H ₄₀ N ₅ O ₈ PSSi + Na] ⁺ : berechnet: 664.1996 gefunden: 664.2003.
Diastereomer 2: 131-27min – 2'-O-TBS	
R_f	0.41 (DCM/MeOH, 10:1). 0.27 (DCM/MeOH, 19:1).
R_t	6.08 min (RP-LCMS, 5 % to 80 % MeCN gradient elution, 8 min run).
¹H-NMR, COSY, NOESY	zusätzlich: ¹ H- ²⁹ Si-HMBC, ¹ H- ³¹ P-HMBC (400 MHz, CDCl ₃): δ = 9.01 (s, 1H, NH), 8.36 (s, 1H, H-dmf), 8.06 (s, 1H, H-5), 6.01 – 5.88 (m, 1H, OCH ₂ CH=CH ₂), 5.57 (bs, 1H, OH-5'), 5.41 – 5.35 (m, 1H, OCH ₂ CH=CH ₂), 5.30 – 5.25 (m, 1H, OCH ₂ CH=CH ₂), 5.04 – 4.98 (m, 1H, H-2'), 4.93 – 4.88 (m, 1H, H-3'), 4.92 (d, ³ J = 8.8 Hz, 1H, H-1'), 4.64 – 4.58 (m, 2H, OCH ₂ CH=CH ₂), 4.39 – 4.36 (m, 1H, H-4'), 4.28 – 4.21 (m, 2H, OCH ₂ CH ₂ CN), 3.83 (dd, ² J = 12.5 Hz, ³ J = 2.3 Hz, 1H, H _a -5'), 3.71 (d, ² J = 12.5 Hz, 1H, H _b -5'), 3.12 (s, 3H, CH ₃ -dmf), 3.04 (s, 3H, CH ₃ -dmf), 2.79 – 2.74 (m, 2H, OCH ₂ CH ₂ CN), 0.73 (s, 9H, SiC(CH ₃) ₃), -0.18 (s, 3H, Si(CH ₃) ₂), -0.31 (s, 3H, Si(CH ₃) ₂) ppm.
¹³C-NMR, HSQC, HMBC	(100.6 MHz, CDCl ₃): δ = 159.3 (C-4), 158.0 (CH-dmf), 155.3 (C-2), 146.4 (C-7a), 132.1 (d, OCH ₂ CH=CH ₂), 126.3 (C-4a), 125.2 (C-5), 124.5 (C-7), 119.2 (OCH ₂ CH=CH ₂), 116.4 (OCH ₂ CH ₂ CN), 85.0 (d, C-4'), 80.7 (d, C-3'), 79.1 (C-1'), 75.1 (d, C-2'), 69.0 (d, OCH ₂ CH=CH ₂), 63.0 (C-5'), 62.0 (d, OCH ₂ CH ₂ CN), 41.1 (CH ₃ -dmf), 35.0 (CH ₃ -dmf), 25.7 (SiC(CH ₃) ₃), 19.8 (d, OCH ₂ CH ₂ CN), 18.1 (SiC(CH ₃) ₃), -5.1 (Si(CH ₃) ₂), -5.4 (Si(CH ₃) ₂) ppm.
²⁹Si-NMR	(80 MHz, CDCl ₃): δ = 22.9 ppm.
³¹P-NMR	(162 MHz, CDCl ₃): δ = -1.6 – -1.9 (m) ppm.
IR	(ATR): $\tilde{\nu}$ = 3397, 2929, 1681, 1631, 1566, 1422, 1280, 1259, 1023, 726 cm ⁻¹ .
ESI-LRMS	m/z für [C ₂₆ H ₄₀ N ₅ O ₈ PSSi + H] ⁺ : berechnet: 642.2 gefunden: 642.4.
ESI-HRMS	m/z für [C ₂₆ H ₄₀ N ₅ O ₈ PSSi + H] ⁺ : berechnet: 642.2177 gefunden: 642.2180. m/z für [C ₂₆ H ₄₀ N ₅ O ₈ PSSi + Na] ⁺ : berechnet: 664.1996

gefunden: 664.2003.

***N*²-DMF-2'-*O*-PO(OallylOCE)-3'-*O*-TBS-thguanosine (86)**

oder

7-[2'-*O*-[Allyloxy(2''-cyanoethoxy)phosphoryl]-3'-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-β-D-ribofuranosyl]-*N*2-[(dimethylamino)methylen]-2-aminothieno[3,4-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-on (86)

Analytische Proben von **86-32min** und **86-34min** wurden über RP-HPLC gewonnen. Dafür wurde das Produktgemisch nach der Säulenchromatographie in 30 % MeCN gelöst.

Präparative RP-HPLC (flow rate: 5 mL/min)

T / min	0	45	48	55	58	60
A (H ₂ O) / %	70	40	20	20	70	70
B (MeCN) / %	30	60	80	80	30	30

Produktfraktionen wurden jeweils von 31.2 – 32.7 min für **86-32min** und 33.3 – 35.8 min für **86-34min** gesammelt. Die Lösemittel wurden evaporiert und über Nacht lyophilisiert, um einen farblosen Feststoff zu erhalten.

Diastereomer 1: 86-32min – 3'-*O*-TBS

***R*_f** 0.41 (DCM/MeOH, 10:1).

***R*_t** 6.30 min (RP-LCMS, 5 % to 80 % MeCN gradient elution, 8 min run).

¹H-NMR, COSY, NOESY **zusätzlich:** ¹H-²⁹Si-HMBC (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.81 (s, 1H, NH), 8.57 (s, 1H, H-dmf), 8.09 (s, 1H, H-5), 5.76 – 5.65 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 5.56 – 5.49 (m, 1H, H-2'), 5.27 (d, ³*J* = 6.9 Hz, 1H, H-1'), 5.22 – 5.16 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 5.15 – 5.11 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 4.48 (dd, ³*J* = 4.6 Hz, ³*J* = 3.0 Hz, 1H, H-3'), 4.32 – 4.27 (m, 2H, OCH₂CH=CH₂), 4.18 – 4.08 (m, 1H, OCH₂CH₂CN), 4.11 – 4.07 (m, 1H, H-4'), 4.02 – 3.94 (m, 1H, OCH₂CH₂CN), 3.87 (dd, ²*J* = 12.4 Hz, ³*J* = 2.3 Hz, 1H, H_a-5'), 3.64 (dd, ²*J* = 12.4 Hz, ³*J* = 1.8 Hz, 1H, H_b-5'), 3.18 (s, 3H, CH₃-dmf), 3.05 (s, 3H, CH₃-dmf), 2.70 – 2.54 (m, 2H, OCH₂CH₂CN), 0.93 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.14 (s, 3H, Si(CH₃)₂), 0.12 (s, 3H, Si(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 159.2 (C-4), 158.6 (CH-dmf), 155.1 (C-2), 146.5 (C-7a), 131.8 (d, OCH₂CH=CH₂), 126.3 (C-4a), 125.5 (C-5), 124.3 (C-7), 118.7 (OCH₂CH=CH₂), 116.3 (OCH₂CH₂CN), 86.3 (C-4'), 79.4 (d, C-2'), 77.6 (d, C-1'), 72.9 (d, C-3'), 68.7 (d, OCH₂CH=CH₂), 62.5 (C-5'), 61.9 (d, OCH₂CH₂CN), 41.3 (CH₃-dmf), 35.1 (CH₃-dmf), 25.9 (SiC(CH₃)₃), 19.6 (d, OCH₂CH₂CN), 18.3 (SiC(CH₃)₃), -4.5 (Si(CH₃)₂), -4.7 (Si(CH₃)₂) ppm.

²⁹Si-NMR (80 MHz, CDCl₃): δ = 22.1 ppm.

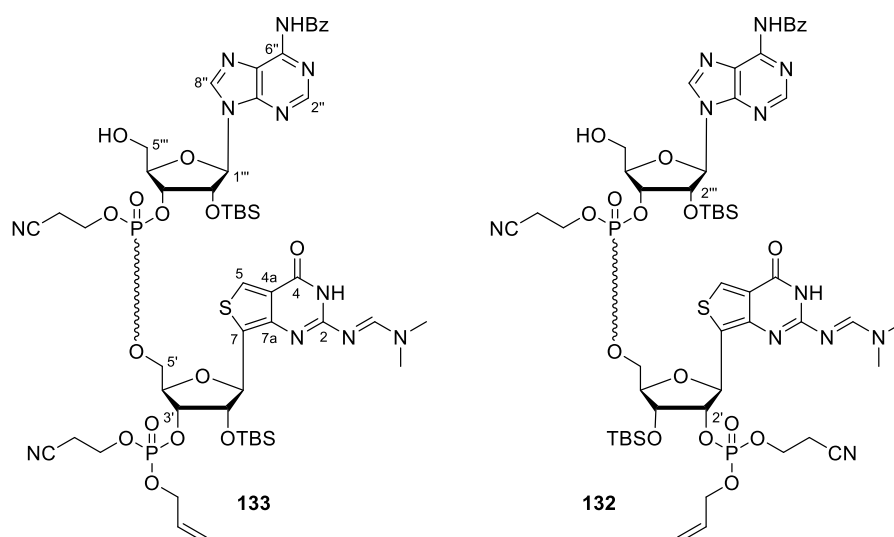
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3438, 2929, 1682, 1630, 1568, 1423, 1352, 1260, 1032, 838 cm⁻¹.

ESI-LRMS m/z für [C₂₆H₄₀N₅O₈PSSi + H]⁺: berechnet: 642.2

gefunden: 642.4.

ESI-HRMS	<p>m/z für $[C_{26}H_{40}N_5O_8PSSi + H]^+$: berechnet: 642.2177 gefounden: 642.2176.</p> <p>m/z für $[C_{26}H_{40}N_5O_8PSSi + Na]^+$: berechnet: 664.1996 gefounden: 664.1999.</p>
Diastereomer 2: 86-34min – 3'-O-TBS	
R_f	0.41 (DCM/MeOH, 10:1).
R_t	6.43 min (RP-LCMS, 5 % to 80 % MeCN gradient elution, 8 min run).
1H-NMR, COSY, NOESY	<p>additionally: 1H-^{29}Si-HMBC (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.87 (s, 1H, NH), 8.59 (s, 1H, H-dmf), 8.09 (d, 4J = 1.1 Hz, 1H, H-5), 5.86 – 5.75 (m, 1H, $OCH_2CH=CH_2$), 5.55 – 5.48 (m, 1H, H-2'), 5.30 – 5.24 (m, 1H, $OCH_2CH=CH_2$), 5.29 (d, 3J = 6.9 Hz, 1H, H-1'), 5.22 – 5.18 (m, 1H, $OCH_2CH=CH_2$), 4.53 – 4.45 (m, 1H, $OCH_2CH=CH_2$), 4.48 – 4.45 (m, 1H, H-3'), 4.37 – 4.29 (m, 1H, $OCH_2CH=CH_2$), 4.11 – 4.08 (m, 1H, H-4'), 4.00 – 3.85 (m, 2H, OCH_2CH_2CN), 3.87 (dd, 2J = 12.4 Hz, 3J = 2.0 Hz, 1H, H_a-5'), 3.65 (dd, 2J = 12.4 Hz, 3J = 1.7 Hz, 1H, H_b-5'), 3.19 (s, 3H, CH_3-dmf), 3.06 (s, 3H, CH_3-dmf), 2.59 – 2.42 (m, 2H, OCH_2CH_2CN), 0.92 (s, 9H, $SiC(CH_3)_3$), 0.14 (s, 3H, $Si(CH_3)_2$), 0.12 (s, 3H, $Si(CH_3)_2$) ppm.</p>
^{13}C-NMR, HSQC, HMBC	<p>(100.6 MHz, $CDCl_3$): δ = 159.2 (C-4), 158.7 (CH-dmf), 155.2 (C-2), 146.5 (C-7a), 131.9 (d, $OCH_2CH=CH_2$), 126.3 (C-4a), 125.5 (C-5), 124.5 (C-7), 118.8 ($OCH_2CH=CH_2$), 116.3 (OCH_2CH_2CN), 86.3 (C-4'), 79.5 (d, C-2'), 77.7 (d, C-1'), 72.9 (d, C-3'), 68.8 (d, $OCH_2CH=CH_2$), 62.5 (C-5'), 61.9 (d, OCH_2CH_2CN), 41.4 (CH_3-dmf), 35.2 (CH_3-dmf), 25.9 ($SiC(CH_3)_3$), 19.5 (d, OCH_2CH_2CN), 18.3 ($SiC(CH_3)_3$), -4.5 ($Si(CH_3)_2$), -4.8 ($Si(CH_3)_2$) ppm.</p>
^{29}Si-NMR	(80 MHz, $CDCl_3$): δ = 22.0 ppm.
IR	(ATR): $\tilde{\nu}$ = 3410, 2928, 1685, 1631, 1571, 1424, 1352, 1261, 1116, 1034 cm^{-1} .
ESI-LRMS	<p>m/z für $[C_{26}H_{40}N_5O_8PSSi + H]^+$: berechnet: 642.2 gefounden: 642.4.</p>
ESI-HRMS	<p>m/z für $[C_{26}H_{40}N_5O_8PSSi + H]^+$: berechnet: 642.2177 gefounden: 642.2176.</p> <p>m/z für $[C_{26}H_{40}N_5O_8PSSi + Na]^+$: berechnet: 664.1996 gefounden: 664.1999.</p>

8.3.3. *N*6''-Bz-2'''-O-TBS-adenosin-3'''-5'-O,O-PO(OCE)-*N*²-DMF-3'-O-PO(OallyLOCE)-2'-O-TBS-th^hguanosin (133**) und *N*6''-Bz-2'''-O-TBS-adenosin'''-5'-O,O-PO(OCE)-*N*²-DMF-2'-O-PO(OallyLOCE)-3'-O-TBS-th^hguanosin (**132**)**



Die Synthese der Titelverbindungen folgte dem Dimerisierungskonzept von Ching et al.^[179] Die isomere Mischung aus **131** und **86** der vorangegangenen Reaktion (1.32 g, 2.06 mmol, 1.00 eq.) wurde in trockenem MeCN (12.7 mL) gelöst und mit einer Lösung von Bz-A-CE Phosphoramidit **85** (2.24 g, 2.27 mmol, 1.10 eq., *commercial*) in MeCN (1 mL) versetzt. Die klare Lösung wurde unter Argon bei RT für 10 min gerührt. Anschließend wurde BTT Aktivator (0.3 M Lösung in MeCN, 13.7 mL, 4.12 mmol, 2.00 eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde für zusätzliche 90 min bei RT gerührt. Eine Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in Decan, 1.12 mL, 6.18 mmol, 3.00 eq.) wurde zugetropft und es wurde für 30 min bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf 0 °C gekühlt und mit wässriger gesättigter NaHSO₃-Lösung (500 mg/mL, 2.57 mL, 12.4 mmol, 6.00 eq.) gequenchet. Nach 5 min wurde die Lösung mit EtOAc (50 mL) verdünnt und mit brine (50 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 × 25 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Bestandteile über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und *in vacuo* konzentriert.

Der Rückstand wurde in DCM (18.2 mL) und H₂O (0.21 mL) gelöst und bei RT gerührt. Durch Zugabe von Dichloressigsäure (6 % v/v in DCM, 18.2 mL) erfolgte ein Farbumschlag von gelb nach tiefrot und die Lösung wurde für 15 min bei RT gerührt. Nach vollständiger DMTr-Entschützung wurde wässrige gesättigte NaHCO₃-Lösung (100 mL) beigemischt und die resultierende gelbe Suspension mit EtOAc (300 mL) und H₂O (100 mL) verdünnt. Die beiden Phasen wurden voneinander getrennt und der wässrige Teil wurde mit weiterem EtOAc (2 × 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und *in vacuo* konzentriert. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, DCM/MeOH, DCM → 49:1 → 19:1) aufgereinigt und als gelber Schaum erhalten. Das isolierte Produkt enthielt eine Mischung aus 4 isomeren Verbindungen, 2 Diastereomere von Molekül **133** und 2 Diastereomere von Molekül **132** (1.61 g, 1.29 mmol, 63 %, untrennbar durch fcc).

***N*6''-Bz-2'''-O-TBS-adenosin-3'''-5'-O,O-PO(OCE)-*N*²-DMF-3'-O-PO(OallyLOCE)-2'-O-TBS-th^hguanosin (**133**)**
oder

[7-[3'-O-[Allyloxy(2''''-cyanoethoxy)phosphoryl]-2'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)- β -D-ribofuranosyl]-N2-[(dimethylamino)methylene]-2-aminothieno[3,4-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-on-5'-yl] [N6''-Benzoylamino-9''-[2'''-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)- β -D-ribofuranosyl]-9''*H*-purin-3'''-yl] (2'''''-cyanoethyl) phosphat (133)

Eine analytische Probe von **133** wurde über RP-HPLC gewonnen. Dafür wurde das Produkt nach der Säulenchromatographie in 30 % MeCN gelöst.

Präparative RP-HPLC (flow rate: 5 mL/min)

T / min	0	15	23	30	33	35
A (H ₂ O) / %	70	40	20	20	70	70
B (MeCN) / %	30	60	80	80	30	30

Produktfraktionen wurden von 21.9 – 22.9 min für **133** gesammelt. Die Lösemittel wurden evaporiert und über Nacht lyophilisiert, um einen farblosen Feststoff zu erhalten.

Verbindung 133 – 3'3'Dimer (Hauptdiastereomer)

R_f 0.27 (DCM/MeOH, 10:1). R_f = 0.23 (DCM/MeOH = 19:1).

R_t (D1) 7.31 min (RP-LCMS, 5 % to 80 % MeCN gradient elution, 8 min run).

R_t (D2) 7.45 min (RP-LCMS, 5 % to 80 % MeCN gradient elution, 8 min run).

¹H-NMR, COSY, NOESY zusätzlich: **¹H-²⁹Si-HMBC, ¹H-³¹P-HMBC** (400 MHz, CDCl₃): δ = 9.25 (bs, 1H, A-NH), 8.80 (s, 1H, H-2''), 8.65 (s, 1H, H-dmf), 8.57 (bs, 1H, G-NH), 8.133 (s, 1H, H-5), 8.128 (s, 1H, H-8''), 8.06 – 8.01 (m, 2H, Bz-*o*-CH), 7.64 – 7.58 (m, 1H, Bz-*p*-CH), 7.56 – 7.50 (m, 2H, Bz-*m*-CH), 6.01 – 5.89 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 5.94 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, H-1'''), 5.50 (d, ³J = 4.9 Hz, 1H, H-1'), 5.42 – 5.36 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 5.30 – 5.26 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 5.25 – 5.18 (m, 1H, H-2'''), 5.09 – 5.03 (m, 1H, H-3'''), 4.89 – 4.83 (m, 1H, H-3'), 4.66 – 4.60 (m, 2H, OCH₂CH=CH₂), 4.59 – 4.52 (m, 1H, H-2'), 4.57 – 4.50 (m, 1H, H-4'''), 4.51 – 4.45 (m, 1H, H_a-5'), 4.46 – 4.40 (m, 1H, H_b-5'), 4.45 – 4.40 (m, 1H, H-4'), 4.37 – 4.27 (m, 2H, A-OCH₂CH₂CN), 4.35 – 4.25 (m, 2H, G-OCH₂CH₂CN), 3.96 – 3.87 (m, 1H, H_a-5'''), 3.85 – 3.76 (m, 1H, H_b-5'''), 3.18 (s, 3H, CH₃-dmf), 3.08 (s, 3H, CH₃-dmf), 2.83 – 2.76 (m, 2H, G-OCH₂CH₂CN), 2.81 – 2.69 (m, 2H, A-OCH₂CH₂CN), 0.84 (s, 9H, G-Si(CH₃)₃), 0.73 (s, 9H, A-Si(CH₃)₃), 0.03 (s, 3H, G-Si(CH₃)₂), -0.05 (s, 3H, G-Si(CH₃)₂), -0.11 (s, 3H, A-Si(CH₃)₂), -0.33 (s, 3H, A-Si(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 164.5 (aryl-CCONH), 159.4 (C-4), 157.8 (CH-dmf), 154.2 (C-2), 152.4 (C-2''), 150.5 (C-6''), 150.4 (C-4''), 147.4 (C-7a), 143.4 (C-8''), 133.6 (aryl-CCONH), 133.1 (Bz-*p*-CH), 131.9 (d, OCH₂CH=CH₂), 129.0 (2x Bz-*o*-CH), 128.0 (2x Bz-*m*-CH), 127.0 (C-4a), 126.0 (C-7), 125.9 (C-5), 124.4 (C-5''), 119.6 (OCH₂CH=CH₂), 116.6 (G-OCH₂CH₂CN), 116.5 (A-OCH₂CH₂CN), 90.4 (C-1'''), 86.1 (C-4'''), 79.7 (C-4'), 79.4 (C-1'), 79.3 (C-3'''), 77.1 (d, C-3'), 77.0 (d, C-2'), 73.5 (d, C-2'''), 69.3 (d, OCH₂CH=CH₂), 68.1 (C-5'), 62.6 (C-5'''), 62.4 (d, G-OCH₂CH₂CN), 62.3 (d, A-OCH₂CH₂CN), 41.4 (CH₃-dmf), 35.3 (CH₃-dmf), 25.8

	(SiC(CH ₃) ₃), 25.7 (SiC(CH ₃) ₃), 19.9 (d, G-OCH ₂ CH ₂ CN), 19.8 (d, A-OCH ₂ CH ₂ CN), 18.2 (G-SiC(CH ₃) ₃), 18.1 (A-SiC(CH ₃) ₃), -4.7 (G-Si(CH ₃) ₂), -4.8 (G-Si(CH ₃) ₂), -4.9 (A-Si(CH ₃) ₂), -5.5 (A-Si(CH ₃) ₂) ppm.	
²⁹Si-NMR	(80 MHz, CDCl ₃): δ = 22.5 (G-TBS), 25.1 (A-TBS) ppm.	
³¹P-NMR	(162 MHz, CDCl ₃): δ = -1.5 – -1.7 (m, 1P, G-P), -2.0 – -2.3 (m, 1P, A-P) ppm.	
IR	(ATR): $\tilde{\nu}$ = 3150, 2931, 1684, 1630, 1572, 1458, 1347, 1255, 1031, 838 cm ⁻¹ .	
ESI-LRMS	m/z für [C ₅₂ H ₇₃ N ₁₁ O ₁₅ P ₂ SSi ₂ + H] ⁺ :	berechnet: 1242.4 gefunden: 1242.7.
ESI-HRMS	m/z für [C ₅₂ H ₇₃ N ₁₁ O ₁₅ P ₂ SSi ₂ + H] ⁺ :	berechnet: 1242.4095 gefunden: 1242.4120.
	m/z für [C ₅₂ H ₇₃ N ₁₁ O ₁₅ P ₂ SSi ₂ - H] ⁻ :	berechnet: 1240.3949 gefunden: 1240.3960.

N6''-Bz-2'''-O-TBS-adenosin-3'''-5'-O, O-PO(OCE)-N²-DMF-2'-O-PO(OallylOCE)-3'-O-TBS-ththguanosin (132)

oder

[7-[2'-O-[Allyloxy(2'''-cyanoethoxy)phosphoryl]-3'-O-(tert-Butyldimethylsilyl)-β-D-ribofuranosyl]-N²-[(dimethylamino)methylene]-2-aminothieno[3,4-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-on-5'-yl] [N6''-Benzoylamino-9''-[2'''-O-(tert-butyldimethylsilyl)-β-D-ribofuranosyl]-9''H-purin-3'''-yl] (2'''''-cyanoethyl) phosphat (132)

Eine analytische Probe von **132** wurde über RP-HPLC gewonnen. Dafür wurde das Produkt nach der Säulenchromatographie in 30 % MeCN gelöst.

Präparative RP-HPLC (flow rate: 5 mL/min)

T / min	0	30	35	42	43	45
A (H ₂ O) / %	70	40	20	20	70	70
B (MeCN) / %	30	60	80	80	30	30

Produktfraktionen wurden von 36.4 – 37.3 min für **132** gesammelt. Die Lösemittel wurden evaporiert und über Nacht lyophilisiert, um einen farblosen Feststoff zu erhalten.

Verbindung 132 – 2'3'Dimer (Hauptdiastereomer)

R_f 0.27 (DCM/MeOH, 10:1). *R_f* = 0.23 (DCM/MeOH = 19:1).

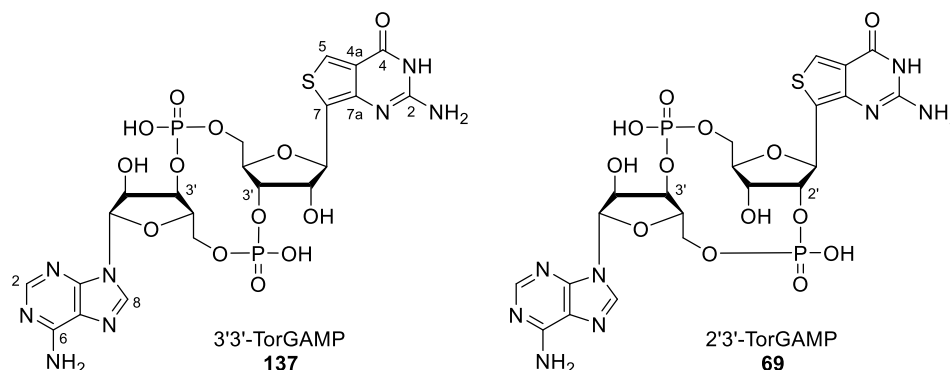
R_t (D1) 7.58 min (RP-LCMS, 5 % to 80 % MeCN gradient elution, 8 min run).

R_t (D2) 7.63 min (RP-LCMS, 5 % to 80 % MeCN gradient elution, 8 min run).

¹H-NMR, COSY, NOESY zusätzlich: ¹H-²⁹Si-HMBC, ¹H-³¹P-HMBC (400 MHz, CDCl₃): δ = 9.25 (d, ³J = 2.2 Hz, 1H, A-NH), 8.94 (s, 1H, H-dmf), 8.80 (s, 1H, H-2''), 8.70 (bs, 1H, G-NH), 8.11 (s, 1H, H-8''), 8.08 (s, 1H, H-5), 8.06 – 8.02 (m, 2H, Bz-*o*-CH), 7.64 – 7.59 (m, 1H, Bz-*p*-CH), 7.55 – 7.50 (m, 2H, Bz-*m*-CH), 5.99

	<p>– 5.84 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 5.92 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, H-1'''), 5.68 (d, ³J = 2.6 Hz, 1H, H-1'), 5.49 – 5.43 (m, 1H, H-2'), 5.39 – 5.36 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 5.30 – 5.26 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 5.24 – 5.19 (m, 1H, H-2'''), 5.10 – 5.05 (m, 1H, H-3'''), 4.66 – 4.55 (m, 2H, OCH₂CH=CH₂), 4.59 – 4.53 (m, 1H, H-4'''), 4.46 – 4.40 (m, 1H, H_a-5'), 4.34 – 4.27 (m, 1H, H_b-5'), 4.36 – 4.27 (m, 2H, A-OCH₂CH₂CN), 4.27 – 4.21 (m, 1H, H-4'), 4.25 – 4.19 (m, 1H, H-3'), 4.19 – 4.11 (m, 2H, G-OCH₂CH₂CN), 3.99 – 3.91 (m, 1H, H_a-5'''), 3.87 – 3.87 (m, 1H, H_b-5'''), 3.24 (s, 3H, CH₃-dmf), 3.08 (s, 3H, CH₃-dmf), 2.81 – 2.71 (m, 2H, A-OCH₂CH₂CN), 2.71 – 2.61 (m, 2H, G-OCH₂CH₂CN), 0.93 (s, 9H, G-Si(CH₃)₃), 0.74 (s, 9H, A-Si(CH₃)₃), 0.15 (s, 3H, G-Si(CH₃)₂), 0.12 (s, 3H, G-Si(CH₃)₂), -0.08 (s, 3H, A-Si(CH₃)₂), -0.33 (s, 3H, A-Si(CH₃)₂) ppm.</p>	
¹³C-NMR, HSQC, HMBC	<p>(100.6 MHz, CDCl₃): δ = 164.5 (aryl-CCONH), 159.3 (C-4), 159.1 (CH-dmf), 154.6 (C-2), 152.5 (C-2''), 150.7 (C-6''), 150.6 (C-4''), 146.1 (C-7a), 143.2 (C-8''), 133.6 (aryl-CCONH), 133.1 (Bz-<i>p</i>-CH), 132.0 (d, OCH₂CH=CH₂), 129.1 (2x Bz-<i>o</i>-CH), 128.1 (2x Bz-<i>m</i>-CH), 126.0 (C-4a), 125.9 (C-7), 125.8 (C-5), 124.5 (C-5''), 119.2 (OCH₂CH=CH₂), 116.5 (G-OCH₂CH₂CN), 116.4 (A-OCH₂CH₂CN), 90.7 (C-1'''), 86.3 (C-4'''), 81.1 (d, C-2'), 80.4 (C-4'), 79.13 (C-1'), 79.08 (C-3'''), 73.4 (d, C-2'''), 71.6 (d, C-3'), 69.1 (d, OCH₂CH=CH₂), 68.6 (C-5'), 62.6 (C-5'''), 62.5 (d, A-OCH₂CH₂CN), 62.2 (d, G-OCH₂CH₂CN), 41.4 (CH₃-dmf), 35.2 (CH₃-dmf), 25.9 (G-Si(CH₃)₃), 25.6 (A-Si(CH₃)₃), 19.9 (d, G-OCH₂CH₂CN), 19.7 (d, A-OCH₂CH₂CN), 18.2 (G-Si(CH₃)₃), 18.0 (A-Si(CH₃)₃), -4.4 (G-Si(CH₃)₂), -4.88 (G-Si(CH₃)₂), -4.93 (A-Si(CH₃)₂), -5.5 (A-Si(CH₃)₂) ppm.</p>	
²⁹Si-NMR	<p>(80 MHz, CDCl₃): δ = 23.4 (G-TBS), 25.1 (A-TBS) ppm.</p>	
³¹P-NMR	<p>(162 MHz, CDCl₃): δ = -2.2 (A-P), -2.5 (G-P) ppm.</p>	
IR	<p>(ATR): $\tilde{\nu}$ = 3145, 2931, 1684, 1630, 1573, 1458, 1349, 1255, 1034, 839 cm⁻¹.</p>	
ESI-LRMS	m/z für [C ₅₂ H ₇₃ N ₁₁ O ₁₅ P ₂ SSi ₂ + H] ⁺ :	<p>berechnet: 1242.4</p> <p>gefunden: 1242.7.</p>
ESI-HRMS	m/z für [C ₅₂ H ₇₃ N ₁₁ O ₁₅ P ₂ SSi ₂ + H] ⁺ :	<p>berechnet: 1242.4095</p> <p>gefunden: 1242.4122.</p>
	m/z für [C ₅₂ H ₇₃ N ₁₁ O ₁₅ P ₂ SSi ₂ - H] ⁻ :	<p>berechnet: 1240.3949</p> <p>gefunden: 1240.3964.</p>

8.3.4. 3'3'-cthGAMP (137) und 2'3'-cthGAMP (69)



Die Synthese der Titelverbindungen wurde nach dem Zyklisierungskonzept von Ching et al.^[179] aufgebaut und erfolgte ausgehend vom Produkt der vorherigen Reaktion in 3 aufeinanderfolgenden Schritten: 1) Allylschutzung, 2) Zyklisierung und 3) finale Entschützung.

1) Allylschutzung

Eine Suspension der linearen Dinukleotidmischung **132** und **133** der vorangegangenen Reaktion (538 mg, 0.433 mmol, 1.00 eq.) und festem Natriumiodid (649 mg, 4.33 mmol, 10.0 eq.) wurde in trockenem Aceton (20 mL) bei 56 °C unter Argon im Dunkeln für 3 h gerührt. Nach Herabkühlen der Reaktion auf RT wurden alle leichtflüchtigen Bestandteile entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie und sehr polaren Bedingungen (Silica Gel, DCM/MeOH, 19:1→9:1→4:1) aufgereinigt und als gelber Feststoff erhalten. Das isolierte Produkt enthielt eine Mischung aus 4 isomeren Verbindungen (367 mg, 0.305 mmol, 70 %, untrennbar durch fcc). Die Charakterisierung erfolgte lediglich über RP-LCMS und ESI-HRMS.

R_f	0.32 (DCM/MeOH = 4:1).
R_t (3'3'-D1)	6.52 min (RP-LCMS, 5 % to 80 % MeCN gradient elution, 8 min run).
R_t (3'3'-D2)	6.58 min (RP-LCMS, 5 % to 80 % MeCN gradient elution, 8 min run).
R_t (2'3'-D1)	6.72 min (RP-LCMS, 5 % to 80 % MeCN gradient elution, 8 min run).
R_t (2'3'-D2)	6.77 min (RP-LCMS, 5 % to 80 % MeCN gradient elution, 8 min run).
ESI-LRMS	m/z für [C ₄₉ H ₆₉ N ₁₁ O ₁₅ P ₂ SSi ₂ + H] ⁺ : berechnet: 1202.4 gefunden: 1202.7.
ESI-HRMS	m/z für [C ₄₉ H ₆₉ N ₁₁ O ₁₅ P ₂ SSi ₂ - H] ⁻ : berechnet: 1200.3636 gefunden: 1200.3645.

2) Zyklisierung

Die Mischung aus 4 entschützten Dinukleotiden der vorherigen Reaktion (367 mg, 0.305 mmol, 1.00 eq.) wurde in trockenem THF (72 mL) gelöst und mit 4 Å MS, 1-Methylimidazol (1.22 mL, 15.3 mmol, 50.0 eq.) und 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (4.62 g, 15.3 mmol) versetzt. Die Reaktion wurde daraufhin für 25 h unter Argon bei RT gerührt. Der Reaktionsumsatz wurde mittels RP-

LCMS verfolgt und nach Beendigung der Reaktion wurde die Reaktionslösung mit H₂O (23.1 mL) vermengt und für eine weitere Stunde gerührt. Die Mischung wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, der wässrige Rückstand mit brine (100 mL) verdünnt und schließlich mit EtOAc (200 mL) und DCM (3 × 200 mL) extrahiert.

Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und *in vacuo* konzentriert. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, DCM/MeOH, 49:1→97:3→19:1) aufgereinigt und als gelber Feststoff **136** und **135** erhalten (177 mg, 0.149 mmol, 49 %).

R_f	0.28 (DCM/MeOH = 19:1).
R_t (136, 3'3')	7.38 min (RP-LCMS, 5 % to 80 % MeCN gradient elution, 8 min run).
R_t (135, 2'3')	7.50 min (RP-LCMS, 5 % to 80 % MeCN gradient elution, 8 min run).
ESI-LRMS	m/z für [C ₄₉ H ₆₇ N ₁₁ O ₁₄ P ₂ SSi ₂ + H] ⁺ : berechnet: 1184.4 gefunden: 1184.4.

3) Entschützung

Das zyklisierte Gemisch aus **136** und **135** (177 mg, 0.149 mmol) wurde in MeOH (25 mL) gelöst und mit Ammoniumhydroxid Lösung (28-30 % NH₃ Base, 25 mL) behandelt. Die Reaktionsmischung wurde daraufhin für 16 h bei RT gerührt. Nach dem Ende der Reaktion (angezeigt durch RP-LCMS), wurde die Lösung *in vacuo* konzentriert und mit Pyridin (3 × 20 mL) coevaporiert. Die Rohproduktmischung wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet.

R_t (3'3')	4.87 min (RP-LCMS, 5 % to 80 % MeCN gradient elution, 8 min run).
R_t (2'3')	5.40 min (RP-LCMS, 5 % to 80 % MeCN gradient elution, 8 min run).
ESI-LRMS	m/z für [C ₃₃ H ₅₂ N ₈ O ₁₃ P ₂ SSi ₂ + H] ⁺ : berechnet: 919.2 gefunden: 919.5.

Zu der isomeren Mischung der vorherigen Reaktion in trockenem Pyridin (6 mL) und trockenem THF (22 mL) wurde Triethylamin Trihydrofluorid (2.51 mL, 15.3 mmol, 50.0 eq.) tropfenweise hinzugegeben. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für 48 h bei RT gerührt. Nach dem Ende der Reaktion (angezeigt durch RP-LCMS), wurde der Überschuss an Fluorid durch Methoxytrimethylsilan (6.3 mL) gequenchet und die Lösung *in vacuo* konzentriert. Der feste Rückstand wurde in MeOH (2.0 mL) gelöst und durch Zugabe von Aceton (60 mL) wieder abgeschieden. Das feste Rohprodukt wurde durch Zentrifugation aufgereinigt und durch Entfernen des Überstands gewonnen.

R_t (3'3'-TorGAMP)	0.61 min (RP-LCMS, 5 % to 80 % MeCN gradient elution, broad peak).
R_t (2'3'-TorGAMP)	1.02 min (RP-LCMS, 5 % to 80 % MeCN gradient elution, broad peak).
ESI-LRMS	m/z für [C ₂₁ H ₂₄ N ₈ O ₁₃ P ₂ S + H] ⁺ : berechnet: 691.1 gefunden: 691.1.
ESI-HRMS	m/z für [C ₂₁ H ₂₄ N ₈ O ₁₃ P ₂ S + H] ⁺ : berechnet: 691.0732

gefunden: 691.0727.

Die Aufreinigung der Zielverbindungen 3'3'-TorGAMP (**137**) und 2'3'-TorGAMP (**69**) erfolgte mittels gepufferter RP-HPLC. Dafür wurde das Rohprodukt in H₂O (0.1M NEt₃/HOAc) gelöst und durch einen HPLC-Lauf mit NEt₃/HOAc und drei konsekutive HPLC-Entsalzungsläufe mit TFA aufgetrennt.

1. Präparative RP-HPLC (flow rate: 5 mL/min)

T / min	0	5	30	33	38	40	45
A (H ₂ O, 0.1M NEt ₃ /HOAc) / %	100	100	60	20	20	100	100
B (MeCN, 0.1M NEt ₃ /HOAc) / %	0	0	40	80	80	0	0

Produktfraktionen wurden jeweils von 13.6 – 14.1 min für 3'3'-TorGAMP (**137**) und 15.5 – 16.5 min für 2'3'-TorGAMP (**69**) gesammelt. Die Lösemittel wurden evaporiert und über Nacht lyophilisiert, um farblose Feststoffe zu erhalten. Die dadurch vorgetrennten Fraktionen von 3'3'-TorGAMP und 2'3'-TorGAMP wurden über drei weitere HPLC-Läufe mit saurem TFA Puffer zusätzlich aufgereinigt und entsalzt. Dafür wurde das Lyophilisat in H₂O (+0.1 % TFA) gelöst.

2. Präparative RP-HPLC (flow rate: 5 mL/min)

T / min	0	5	23	24	26	27	30
A (H ₂ O, 0.1 % TFA) / %	100	100	60	20	20	100	100
B (MeCN, 0.1 % TFA) / %	0	0	40	80	80	0	0

Produktfraktionen wurden jeweils von 12.5 – 13.1 min für 3'3'-TorGAMP (**137**) und 13.6 – 14.6 min für 2'3'-TorGAMP (**69**) gesammelt. Die Lösemittel wurden evaporiert und über Nacht lyophilisiert, um farblose Feststoffe zu erhalten.

3'3'-cthGAMP, 3'3'-TorGAMP, cyclic [thGp(3'-5')Ap(3'-5')] (137**)**

oder

Zyklisches [(7-β-D-ribofuranosyl)-2-aminothieno[3,4-d]pyrimidin-4(3H)-on] (3'-5') monophosphat adenosin (3'-5') monophosphate (137**)**

R_t 12.9 min (RP-HPLC, 0 % to 40 % MeCN gradient elution, 30 min run).

¹H-NMR, COSY, NOESY zusätzlich: ¹H-³¹P-HMBC (800 MHz, D₂O): δ = 8.65 (s, 1H, A_H-2), 8.51 (s, 1H, G_H-5), 8.46 (s, 1H, A_H-8), 6.28 (s, 1H, A_H-1'), 5.58 (d, ³J = 2.6 Hz, 1H, G_H-1'), 4.97 – 4.91 (m, 1H, G_H-3'), 4.91 – 4.85 (m, 1H, A_H-3'), 4.83 – 4.78 (m, 1H, A_H-4'), 4.61 – 4.58 (m, 1H, G_H-2'), 4.54 – 4.49 (m, 1H, A_H-2'), 4.46 – 4.43 (m, 1H, G_H-4'), 4.44 – 4.40 (m, 1H, G_H-5'), 4.27 – 4.22 (m, 1H, A_H-5'), 4.14 – 4.08 (m, 1H, G_H-5'), 4.07 – 4.01 (m, 1H, A_H-5') ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, D₂O): δ = 157.7 (G_C-4), 151.2 (G_C-2), 149.9 (A_C-6), 147.6 (A_C-4), 144.8 (A_C-8), 142.0 (A_C-2), 132.6 (G_C-5), 132.3 (G_C-7a), 120.3 (G_C-4a), 119.4 (G_C-7), 118.8 (A_C-5), 90.0 (A_C-1'), 79.9 (A_C-2'), 78.1 (G_C-4'), 76.9 (G_C-1'), 73.8 (A_C-4'), 73.4 (G_C-3'), 72.6 (G_C-2'), 70.3 (A_C-3'), 63.3 (A_C-5'), 62.2 (G_C-5') ppm.

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ = -1.1 – -1.3 (m, 1P, A_C-5'-P), -1.5 – -1.8 (m, 1P, G_C-5'-P) ppm.

ESI-HRMS m/z für [C₂₁H₂₄N₈O₁₃P₂S + H]⁺: berechnet: 691.0732
 gefunden: 691.0740.
 m/z für [C₂₁H₂₄N₈O₁₃P₂S - H]⁻: berechnet: 689.0586
 gefunden: 689.0585.

2'3'-cthGAMP, 2'3'-TorGAMP, cyclic [thGp(2'-5')Ap(3'-5')] (69)

oder

Zyklisches [(7-β-D-ribofuranosyl)-2-aminothieno[3,4-d]pyrimidin-4(3H)-on] (2'-5') monophosphat adenosin (3'-5') monophosphate (69)

R_t 14.3 min (RP-HPLC, 0 % to 40 % MeCN gradient elution, 30 min run).

¹H-NMR, COSY, NOESY zusätzlich: **¹H-³¹P-HMBC** (800 MHz, D₂O): δ = 8.44 (s, 1H, A_H-2), 8.31 (s, 1H, A_H-8), 7.77 (s, 1H, G_H-5), 6.11 (s, 1H, A_H-1'), 5.40 (s, 1H, G_H-1'), 4.89 – 4.83 (m, 1H, A_H-3'), 4.85 – 4.79 (m, 1H, A_H-2'), 4.72 – 4.64 (m, 1H, G_H-2'), 4.52 – 4.46 (m, 1H, A_H-4'), 4.48 – 4.42 (m, 1H, G_H-4'), 4.40 – 4.37 (m, 1H, A_Ha-5'), 4.38 – 4.32 (m, 1H, G_Ha-5'), 4.30 – 4.24 (m, 1H, G_H-3'), 4.08 (dd, ²J = 11.8 Hz, ³J = 4.4 Hz, 1H, G_Hb-5'), 4.03 (dd, ²J = 11.7 Hz, ³J = 4.1 Hz, 1H, A_Hb-5') ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, D₂O): δ = 156.0 (G_C-4), 153.1 (G_C-2), 149.8 (A_C-6), 147.0 (A_C-4), 145.0 (A_C-8), 142.0 (A_C-2), 130.7 (G_C-5), 129.9 (G_C-7a), 123.6 (G_C-7), 120.0 (G_C-4a), 118.5 (A_C-5), 90.9 (A_C-1'), 81.7 (G_C1'), 80.4 (A_C-4'), 78.5 (G_C-3'), 75.8 (G_C-4'), 73.6 (A_C-2'), 71.2 (G_C-2'), 70.0 (A_C-3'), 62.2 (A_C-5'), 61.9 (G_C-5') ppm.

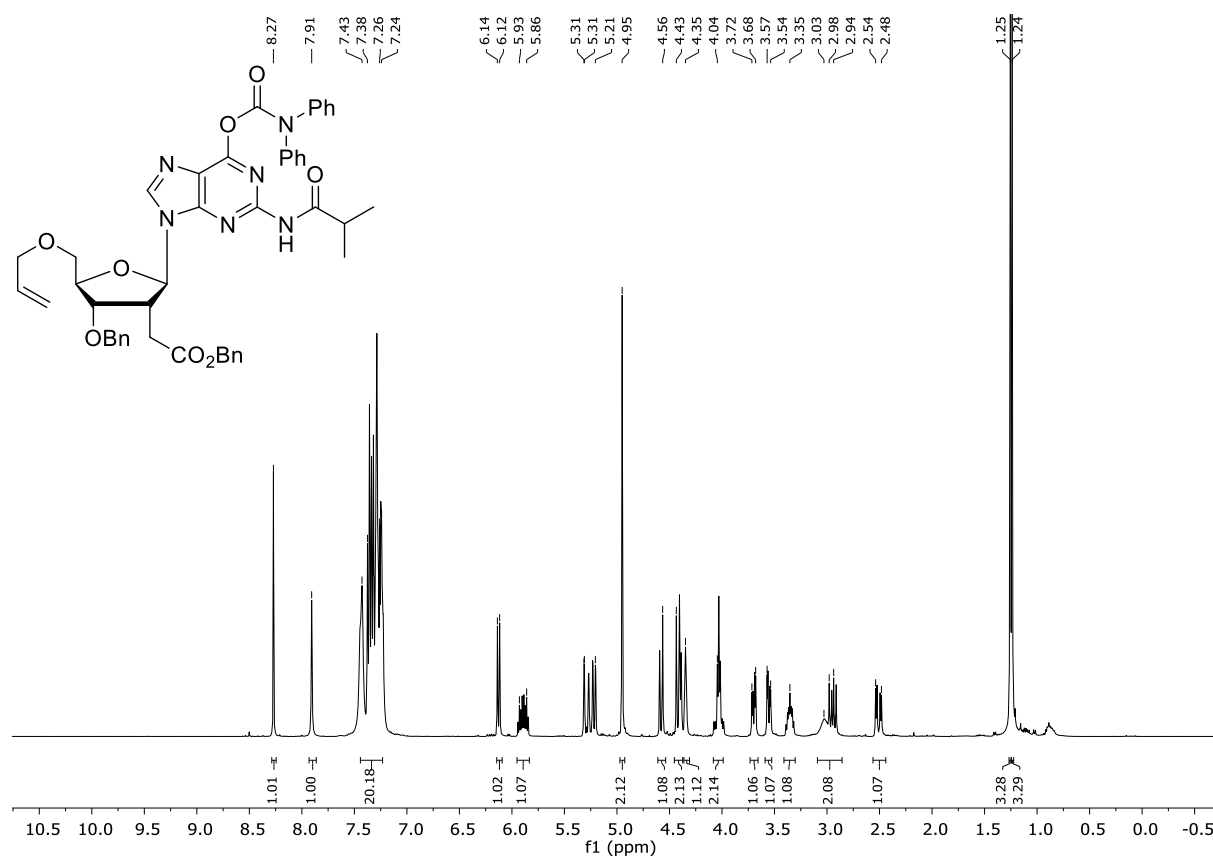
³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ = -1.6 – -1.9 (2P) ppm.

ESI-HRMS m/z für [C₂₁H₂₄N₈O₁₃P₂S + H]⁺: berechnet: 691.0732
 gefunden: 691.0743.
 m/z für [C₂₁H₂₄N₈O₁₃P₂S - H]⁻: berechnet: 689.0586
 gefunden: 689.0585.

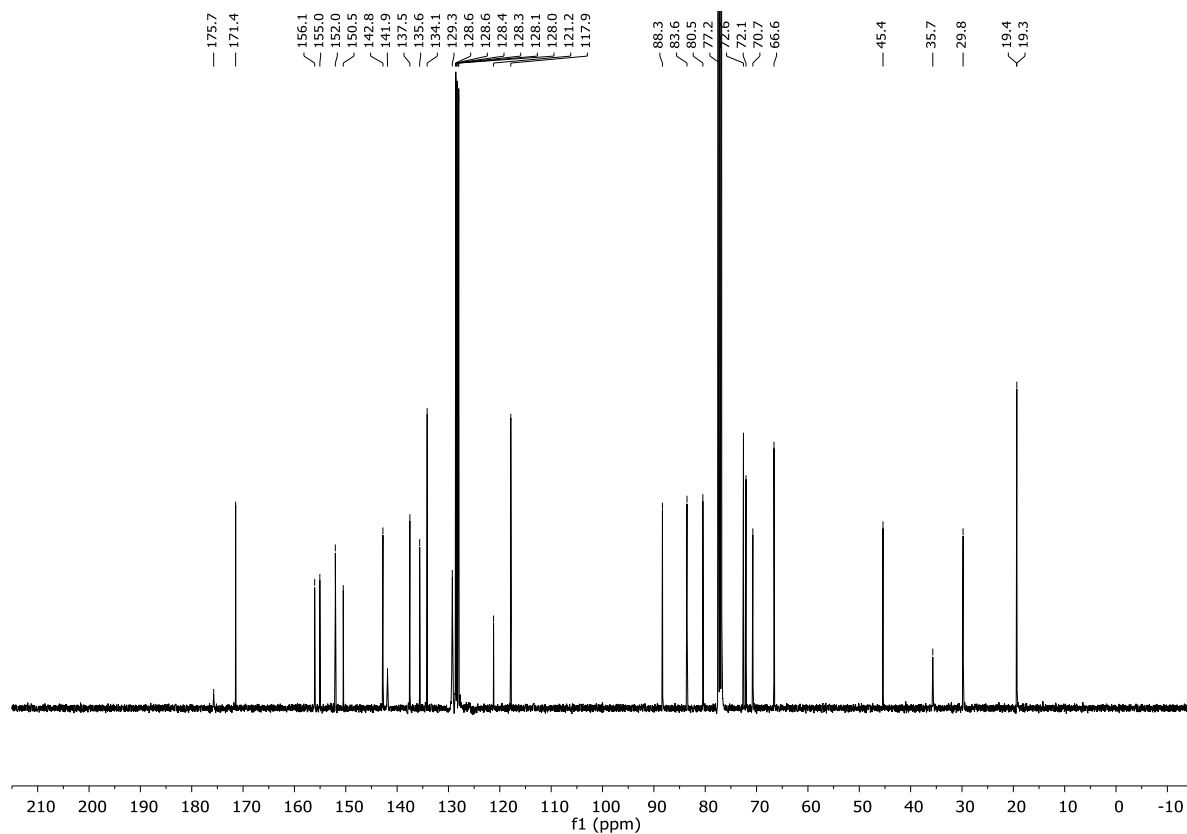
ANHANG

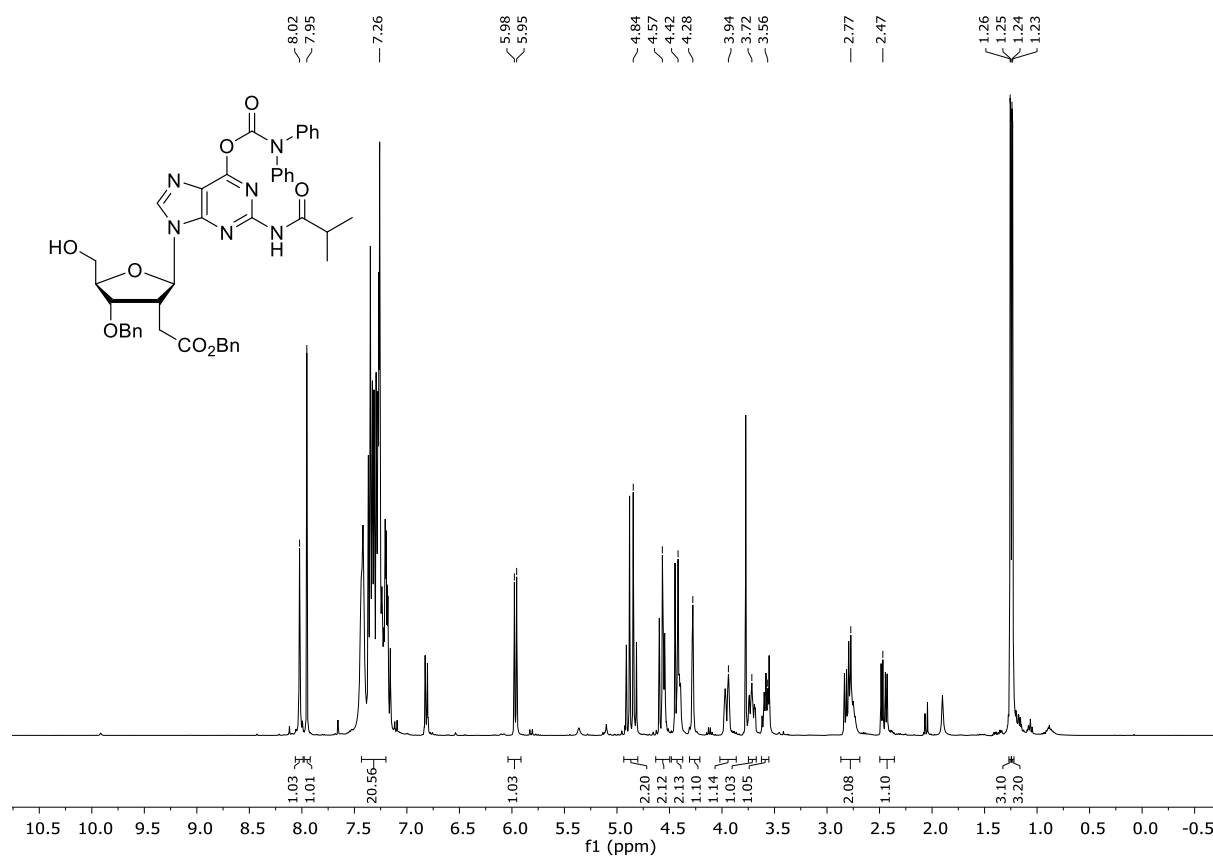
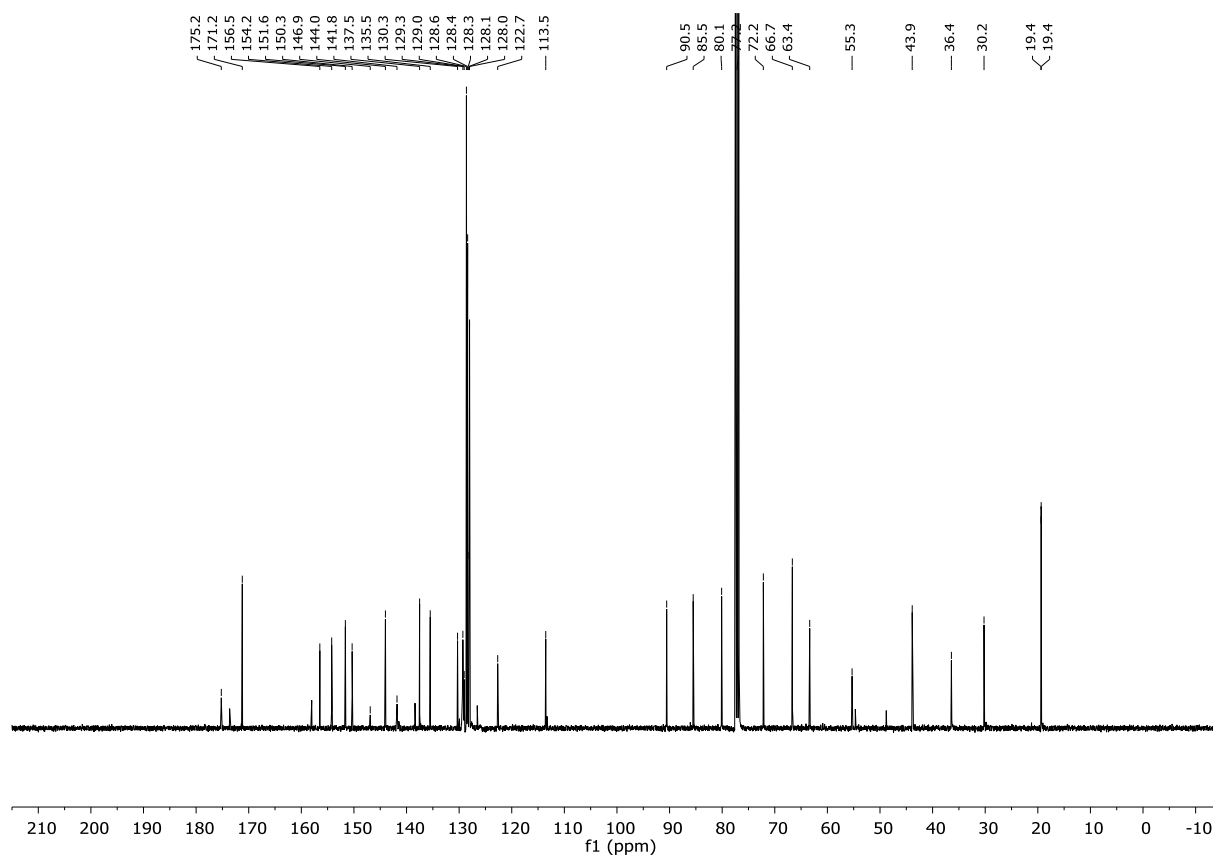
9. $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -2D-NMR Spektren

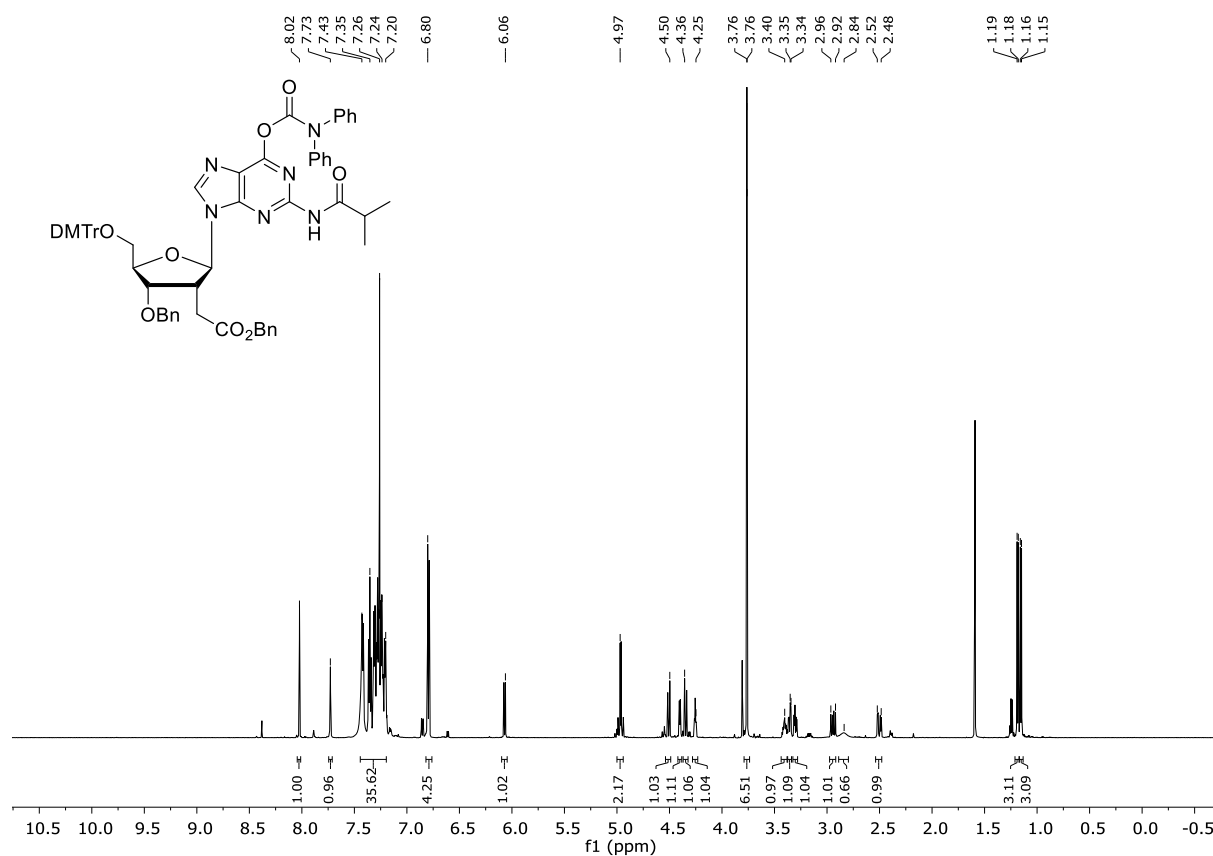
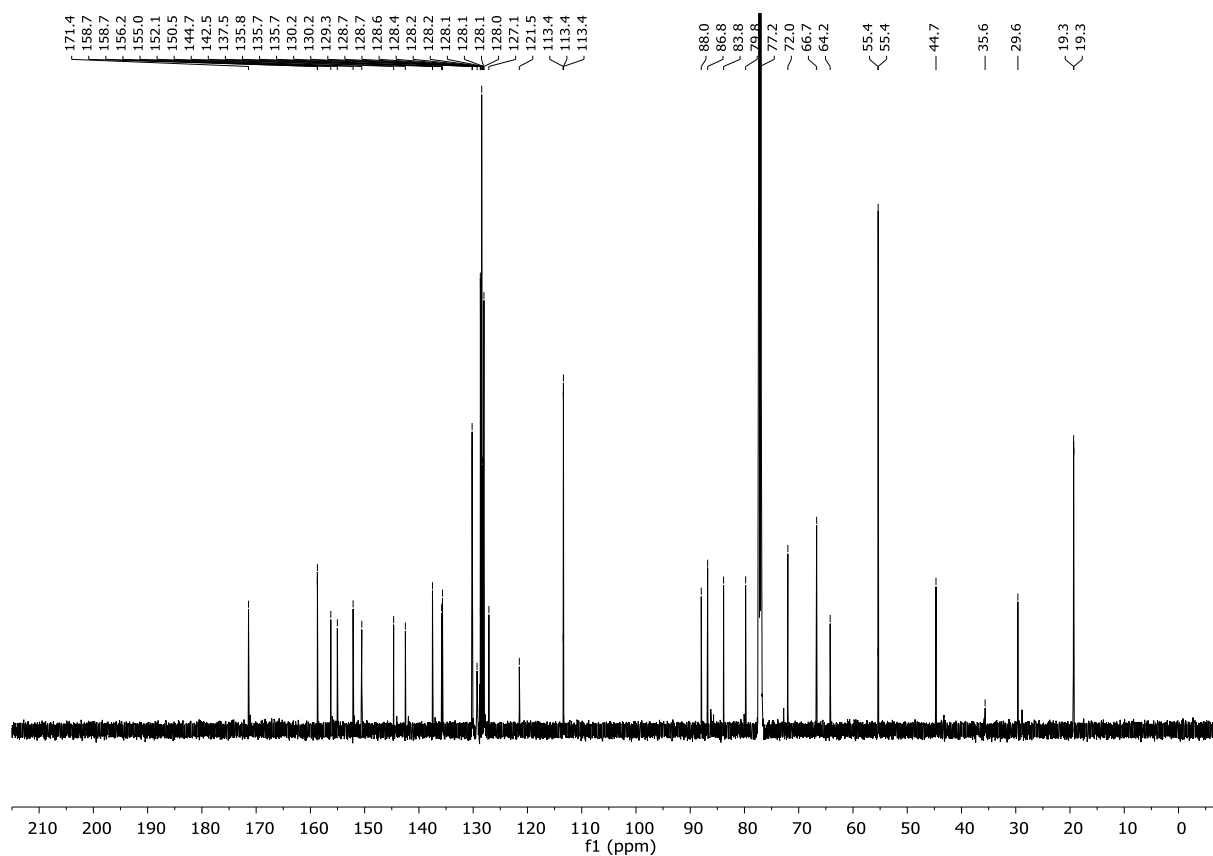
Verbindung **75** (^1H -NMR, 400 MHz, Chloroform-*d*)

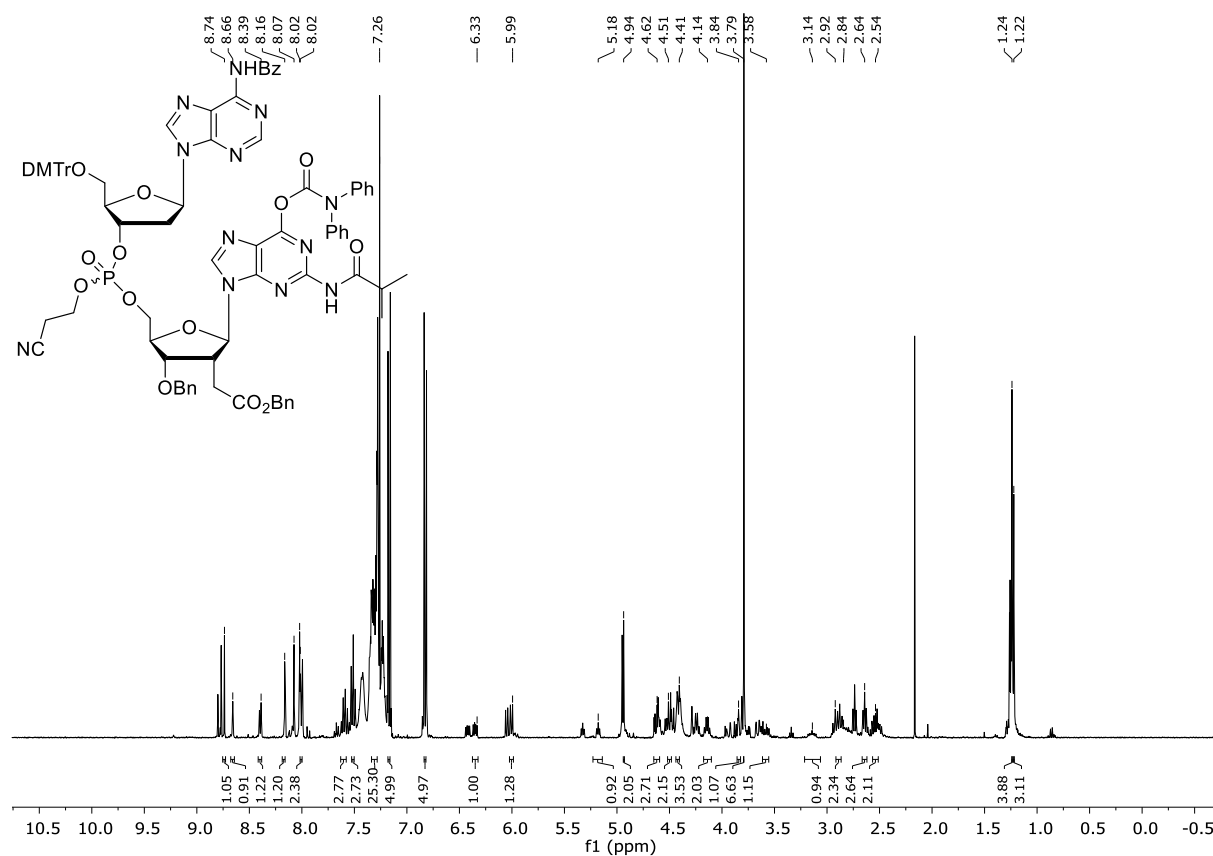
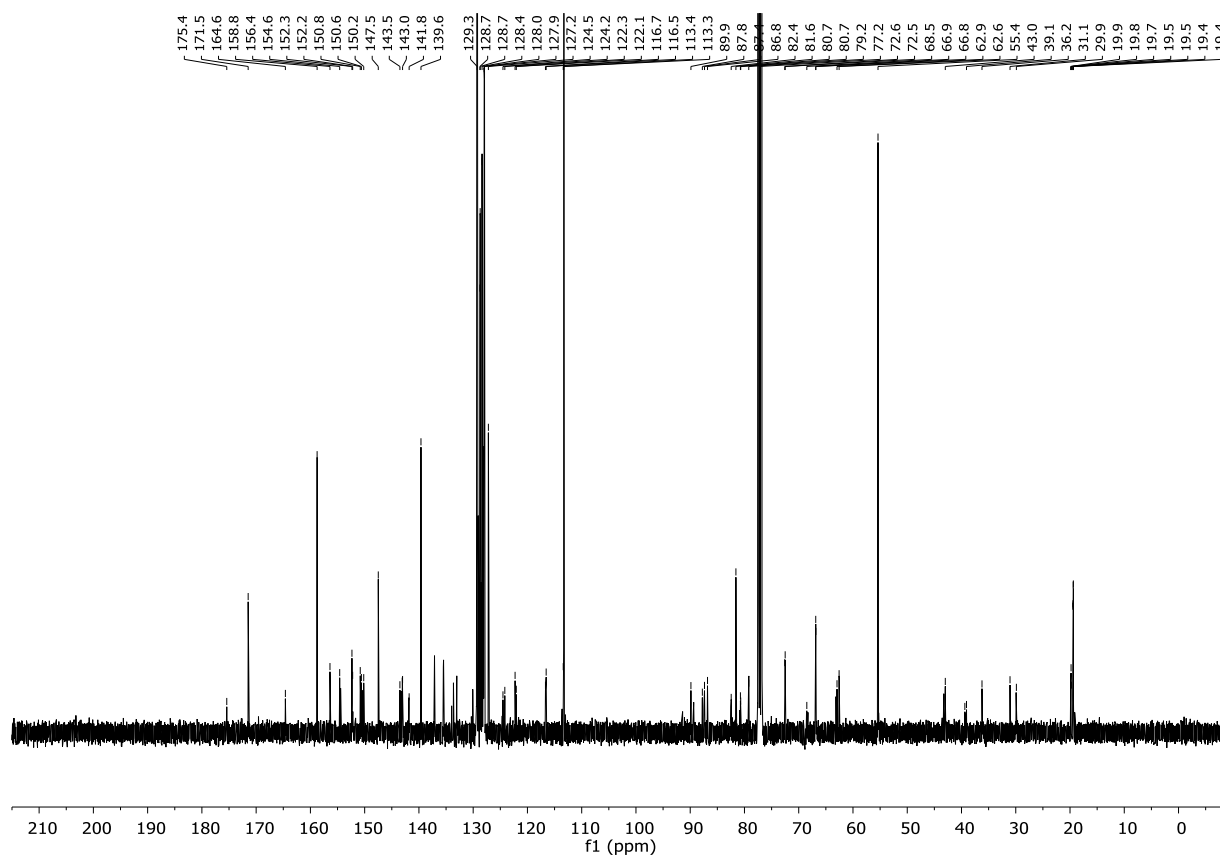


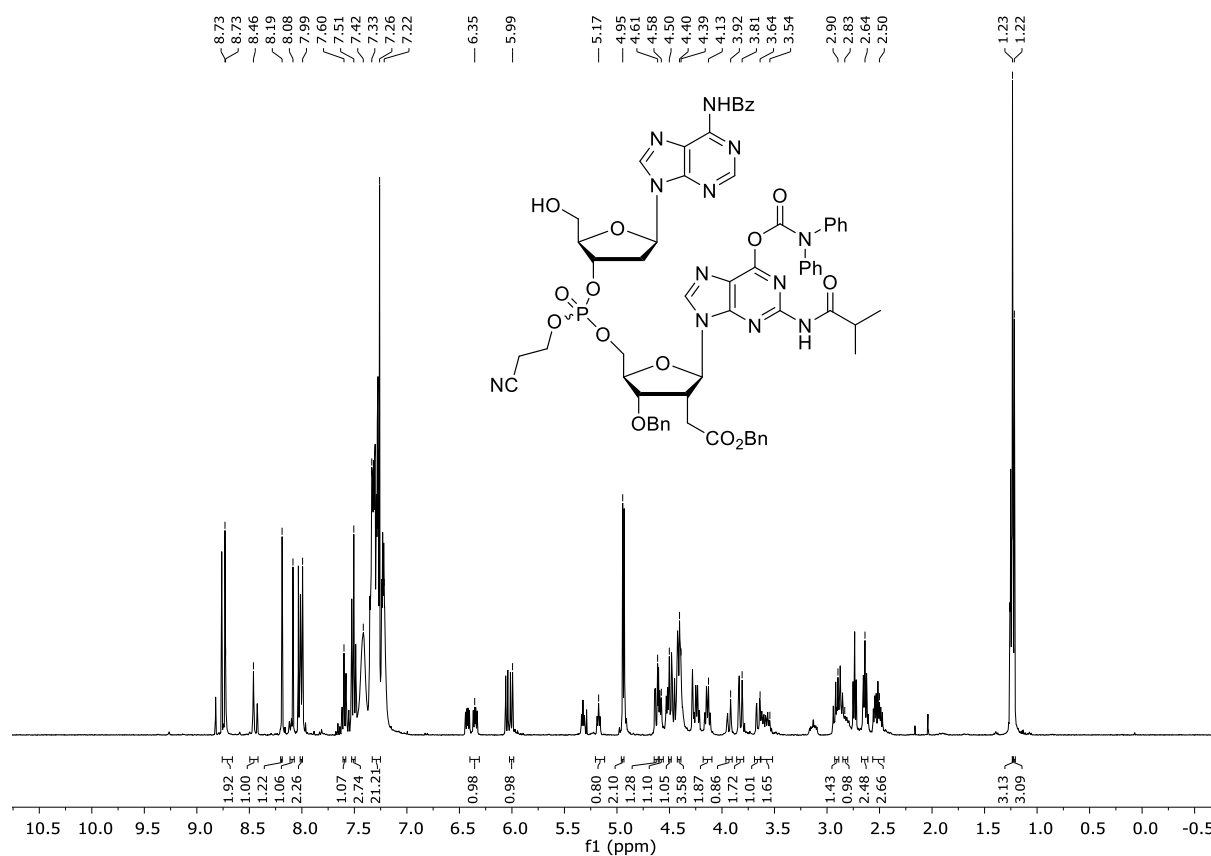
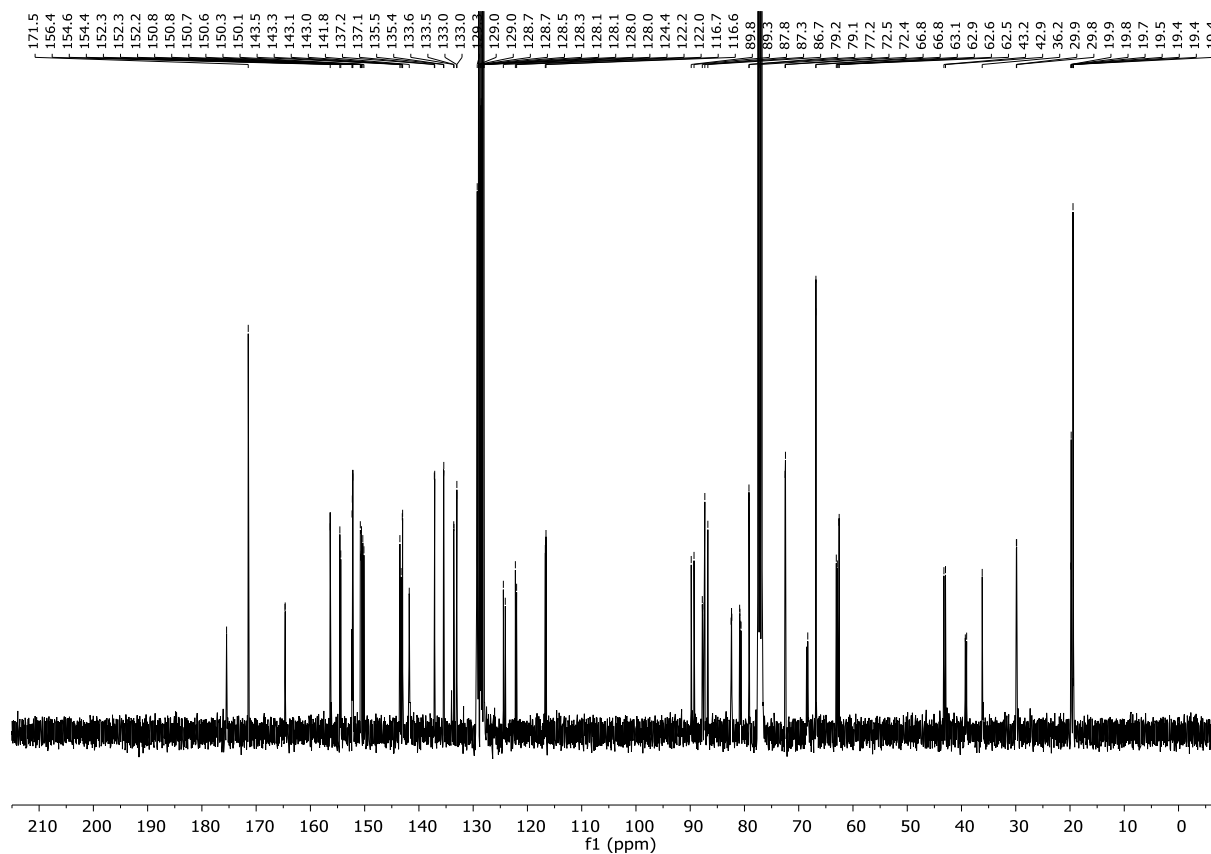
Verbindung **75** (^{13}C -NMR, 101 MHz, Chloroform-*d*)

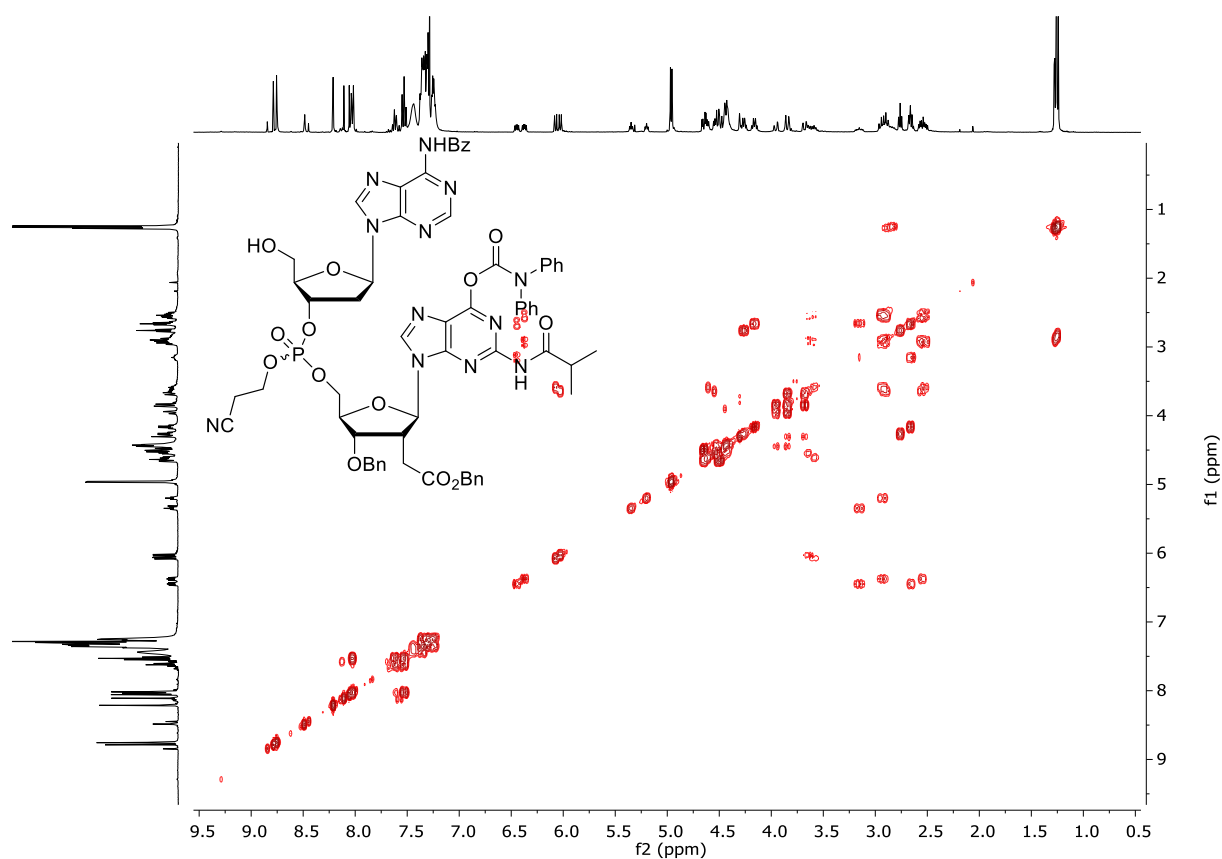
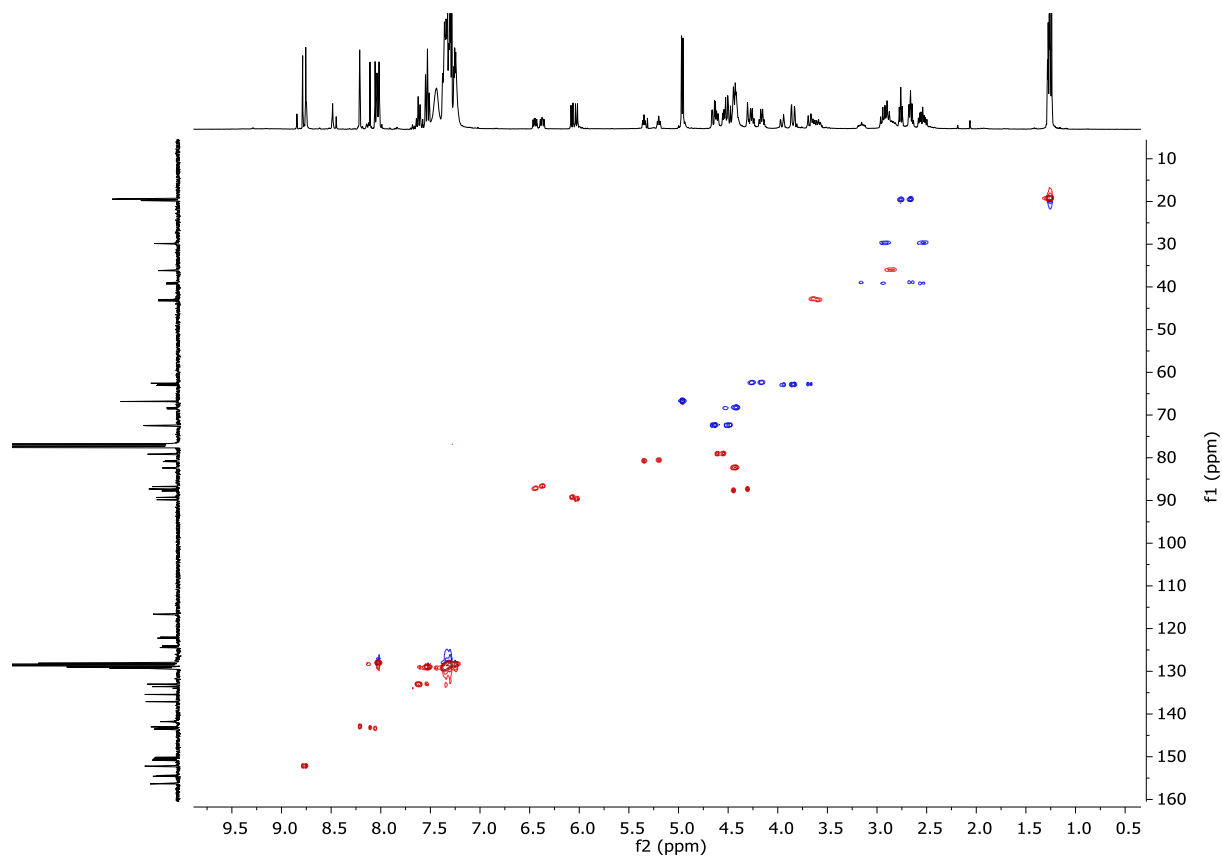


Verbindung **99** (^1H -NMR, 400 MHz, Chloroform-*d*)Verbindung **99** (^{13}C -NMR, 101 MHz, Chloroform-*d*)

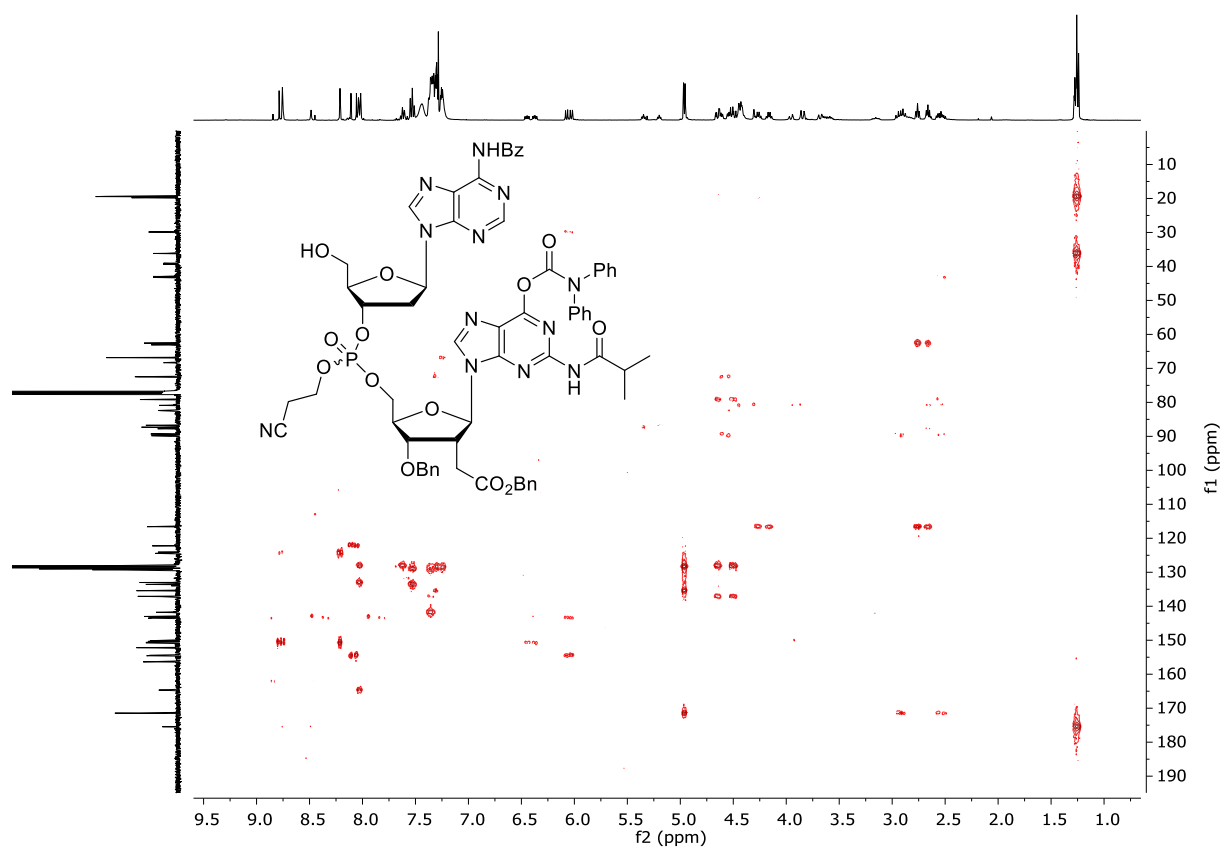
Verbindung **118** (^1H -NMR, 400 MHz, Chloroform- d)Verbindung **118** (^{13}C -NMR, 101 MHz, Chloroform- d)

Verbindung **104** (D1/D2 = 1:1.1) (^1H -NMR, 400 MHz, Chloroform- d)Verbindung **104** (D1/D2 = 1:1.1) (^{13}C -NMR, 101 MHz, Chloroform- d)

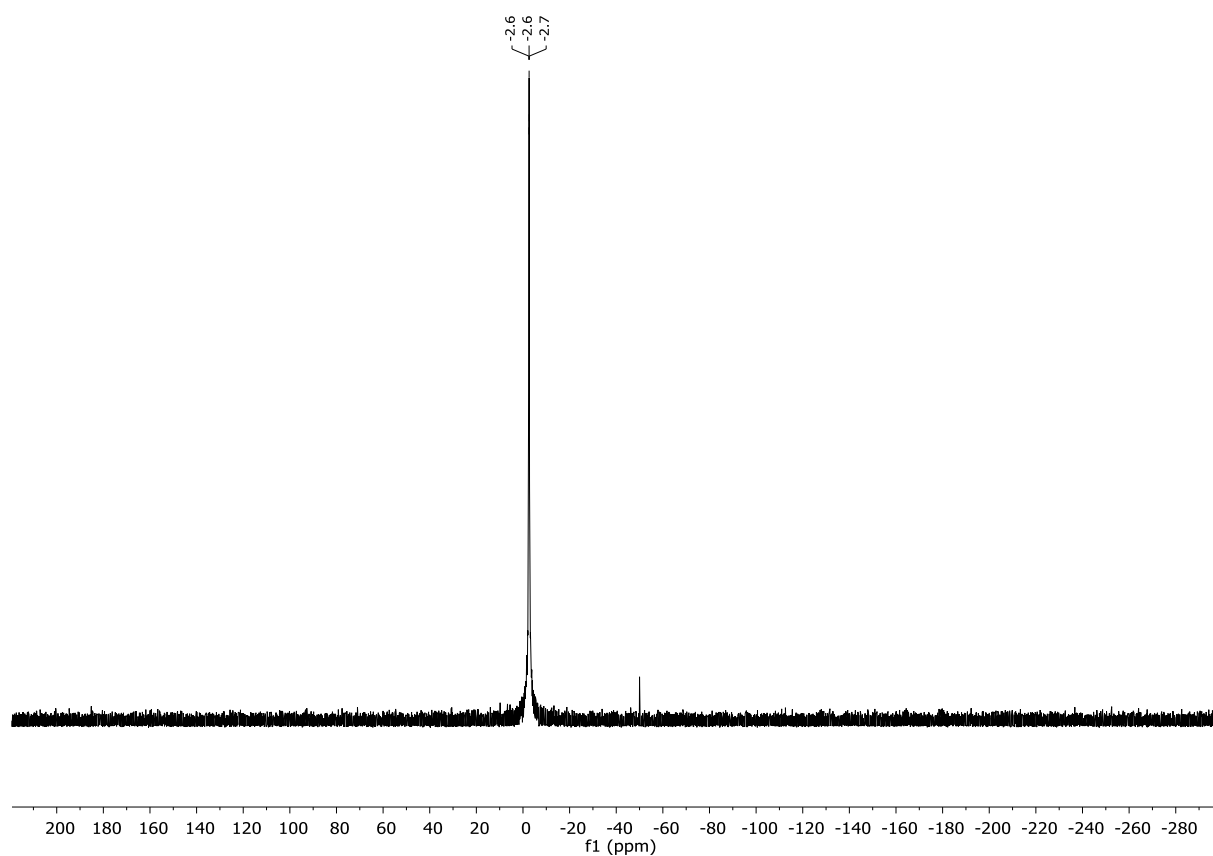
Verbindung **106** (D1/D2 = 1:1.1) (^1H -NMR, 400 MHz, Chloroform- d)Verbindung **106** (D1/D2 = 1:1.1) (^{13}C -NMR, 101 MHz, Chloroform- d)

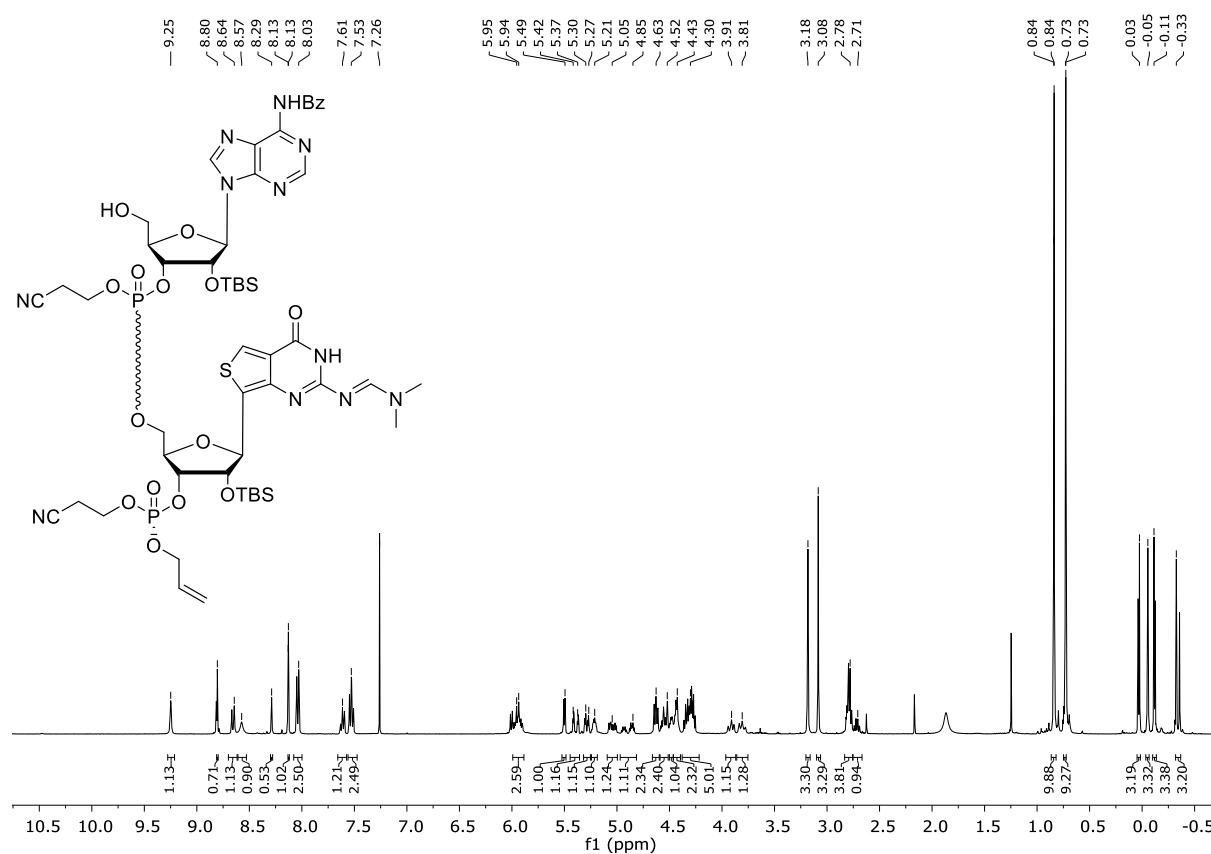
Verbindung **106** (D1/D2 = 1:1.1) (COSY, 400 MHz, Chloroform-*d*)Verbindung **106** (D1/D2 = 1:1.1) (HSQC, 101 MHz, Chloroform-*d*)

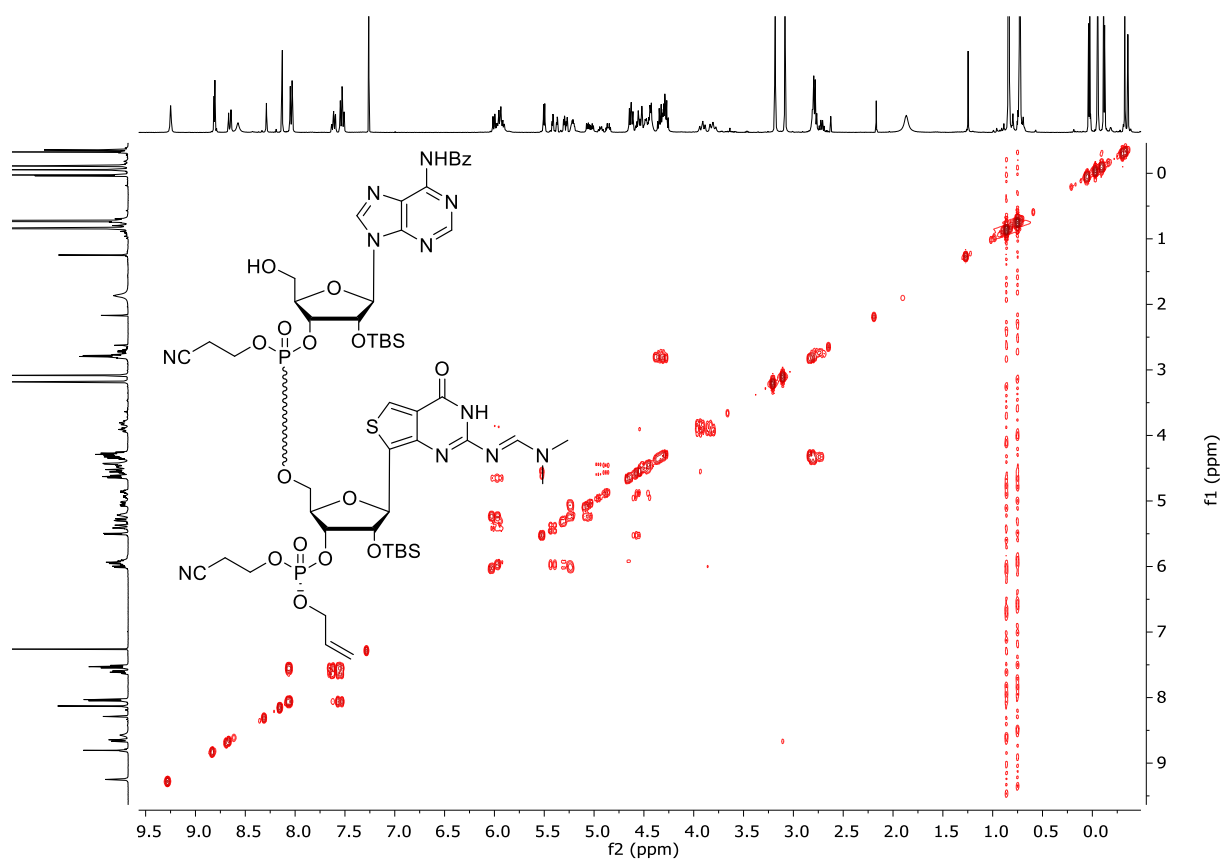
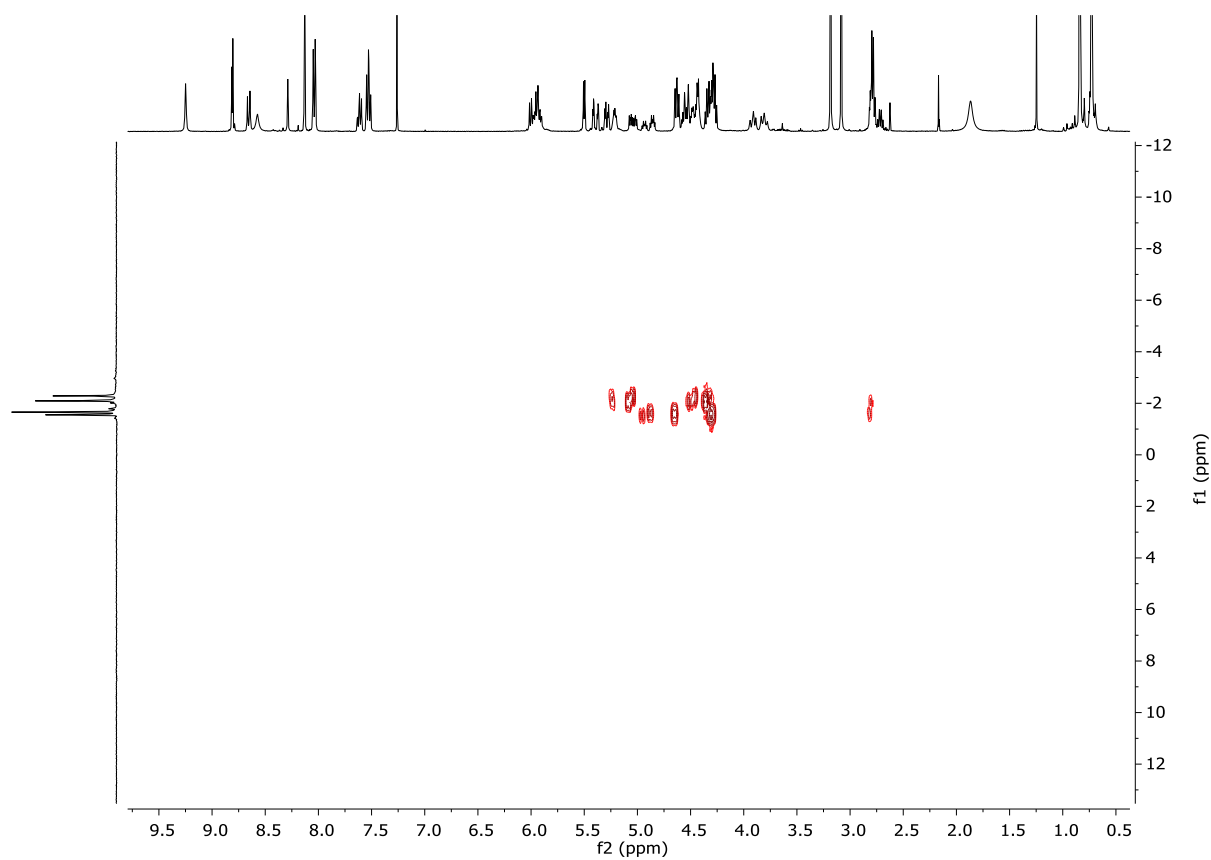
Verbindung **106** (D1/D2 = 1:1.1) (HMBC, 400 MHz, Chloroform-*d*)

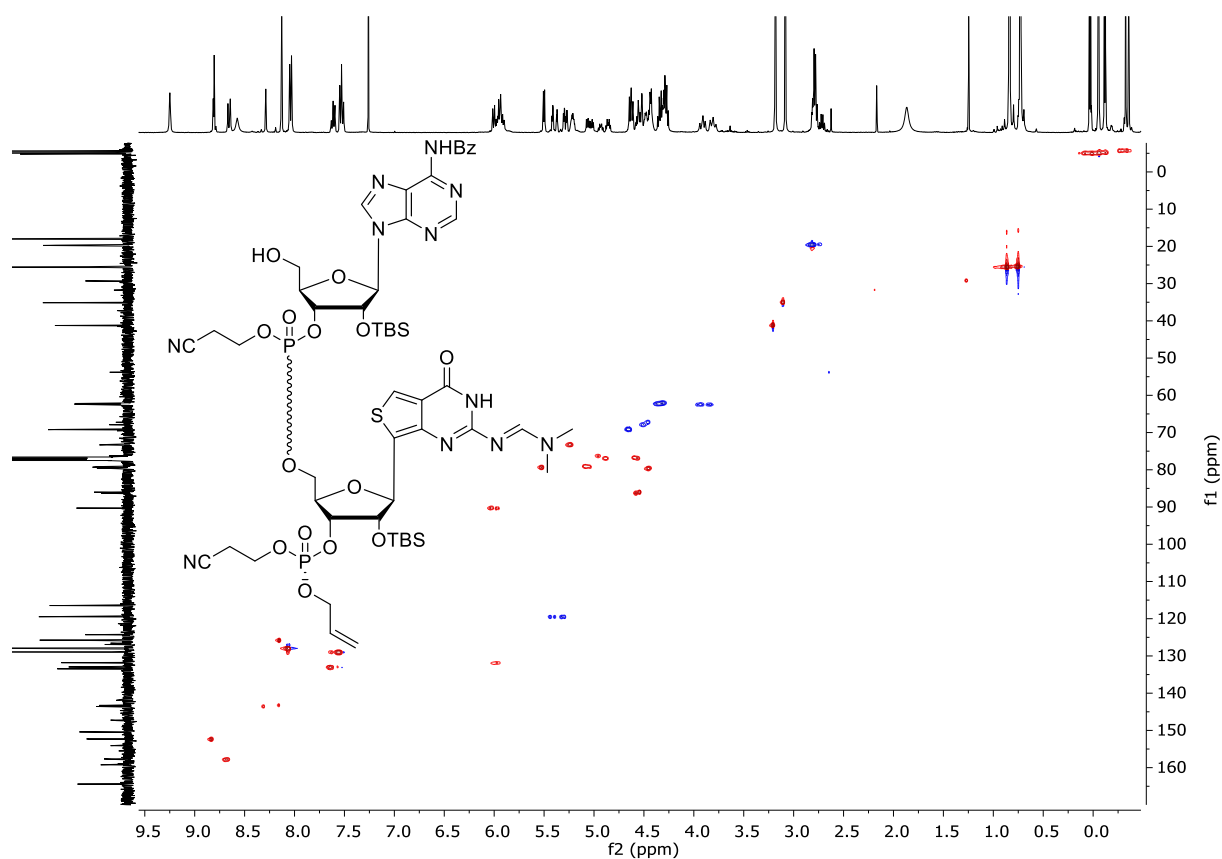
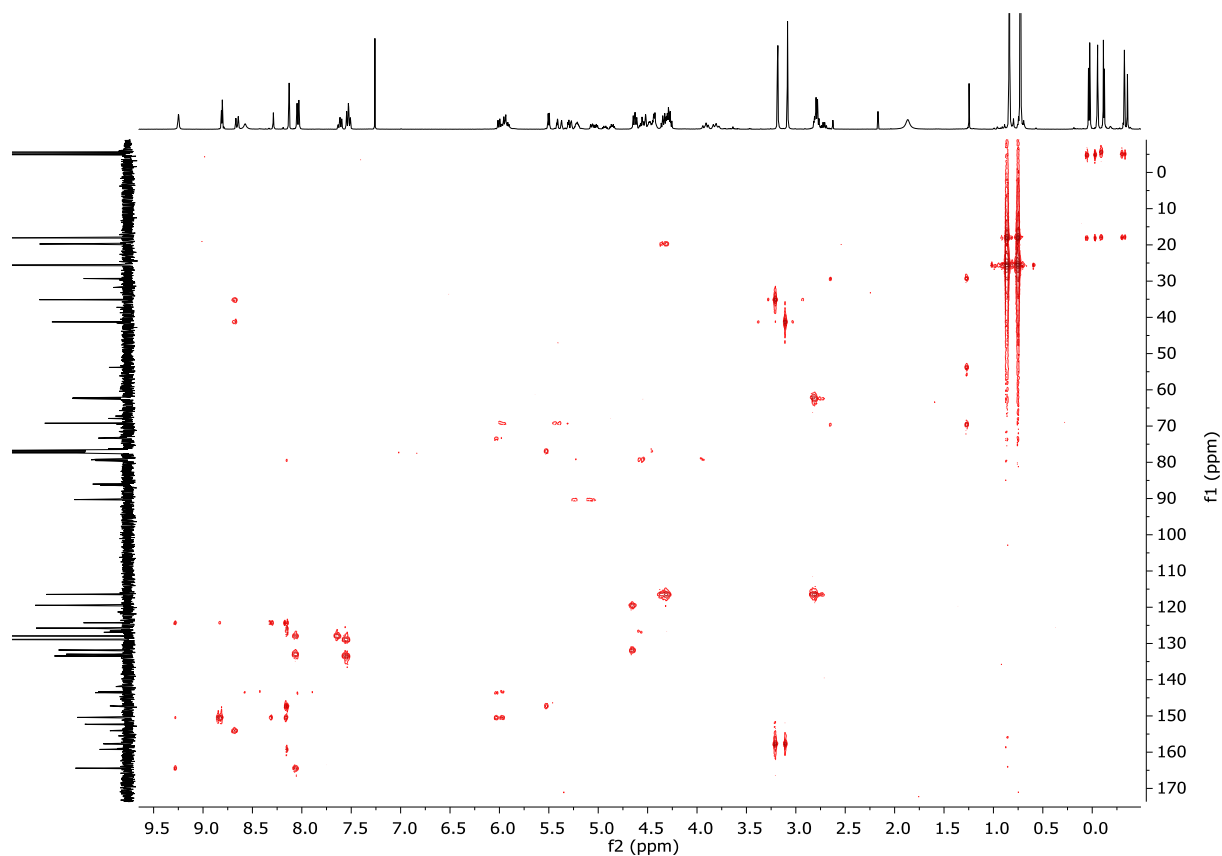


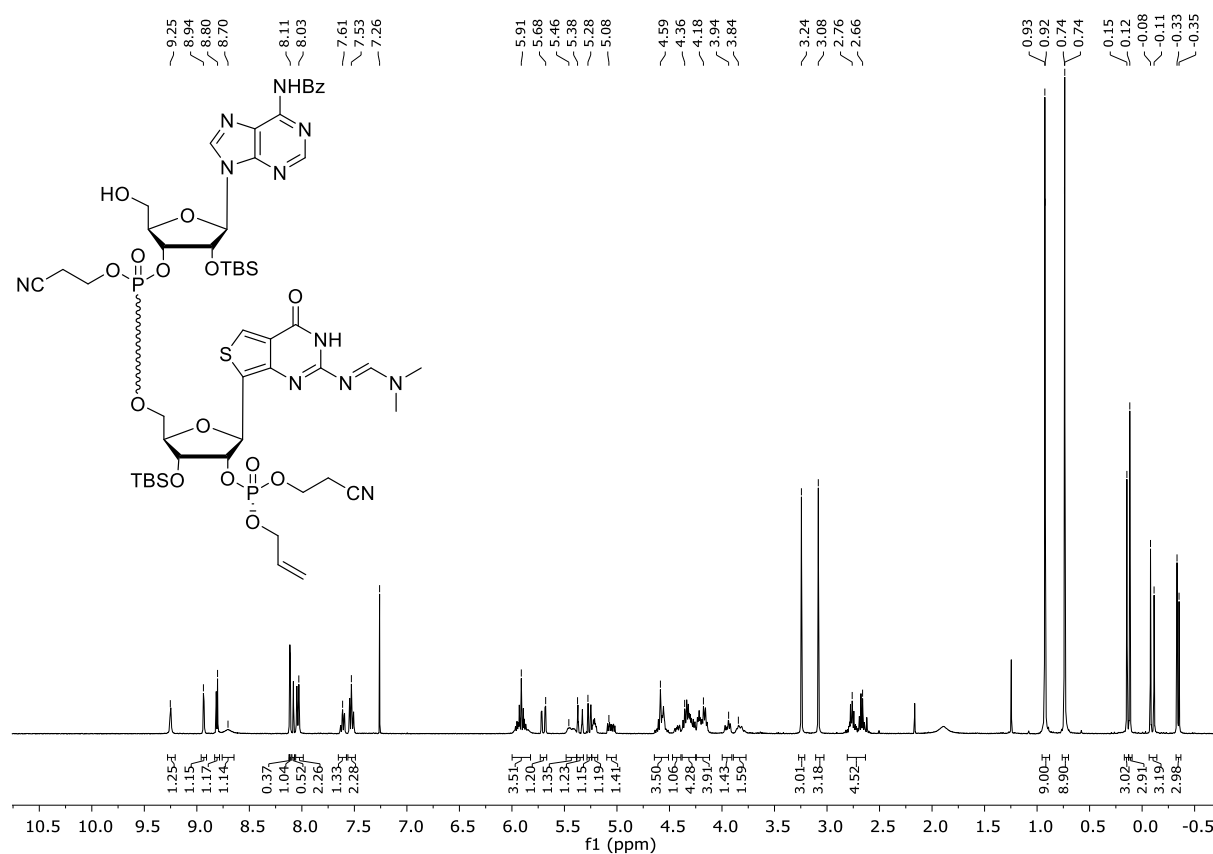
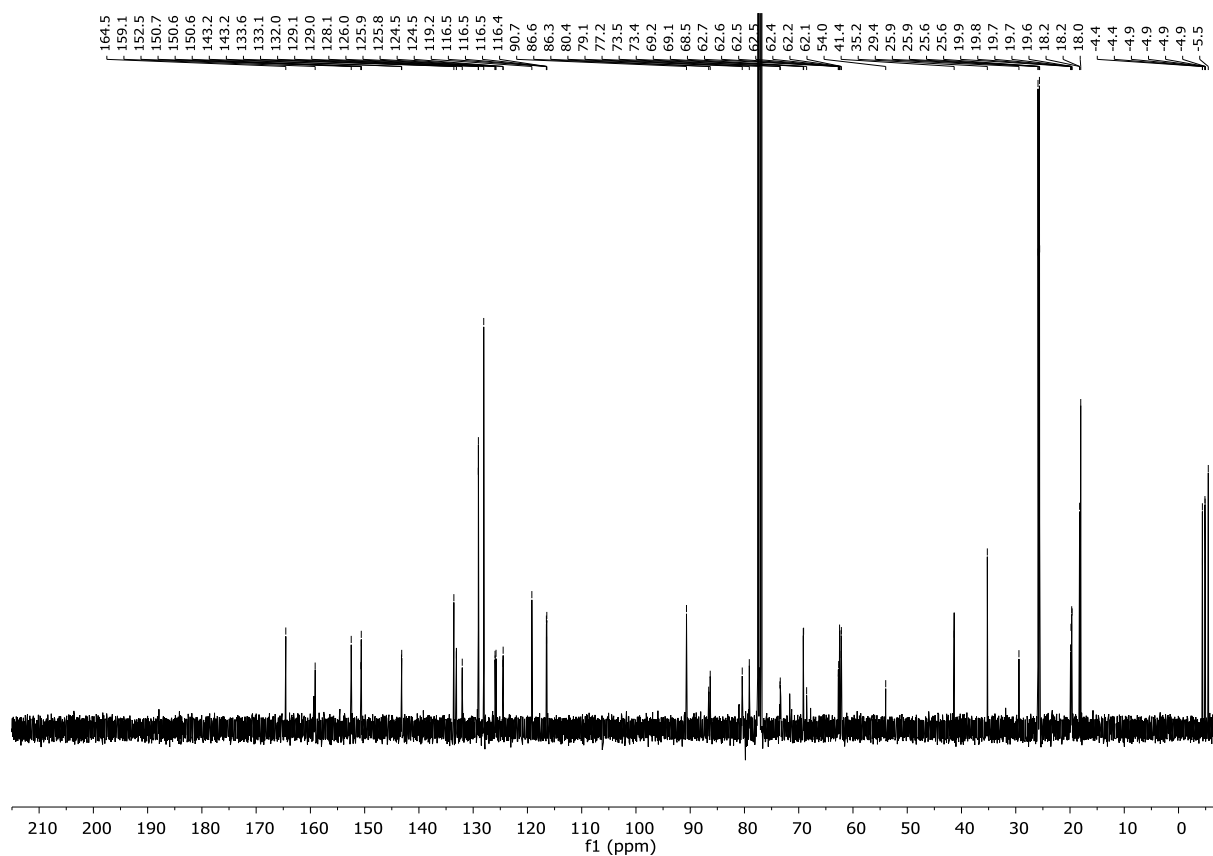
Verbindung **106** (D1/D2 = 1:1.1) (^{31}P -NMR, 162 MHz, Chloroform-*d*)

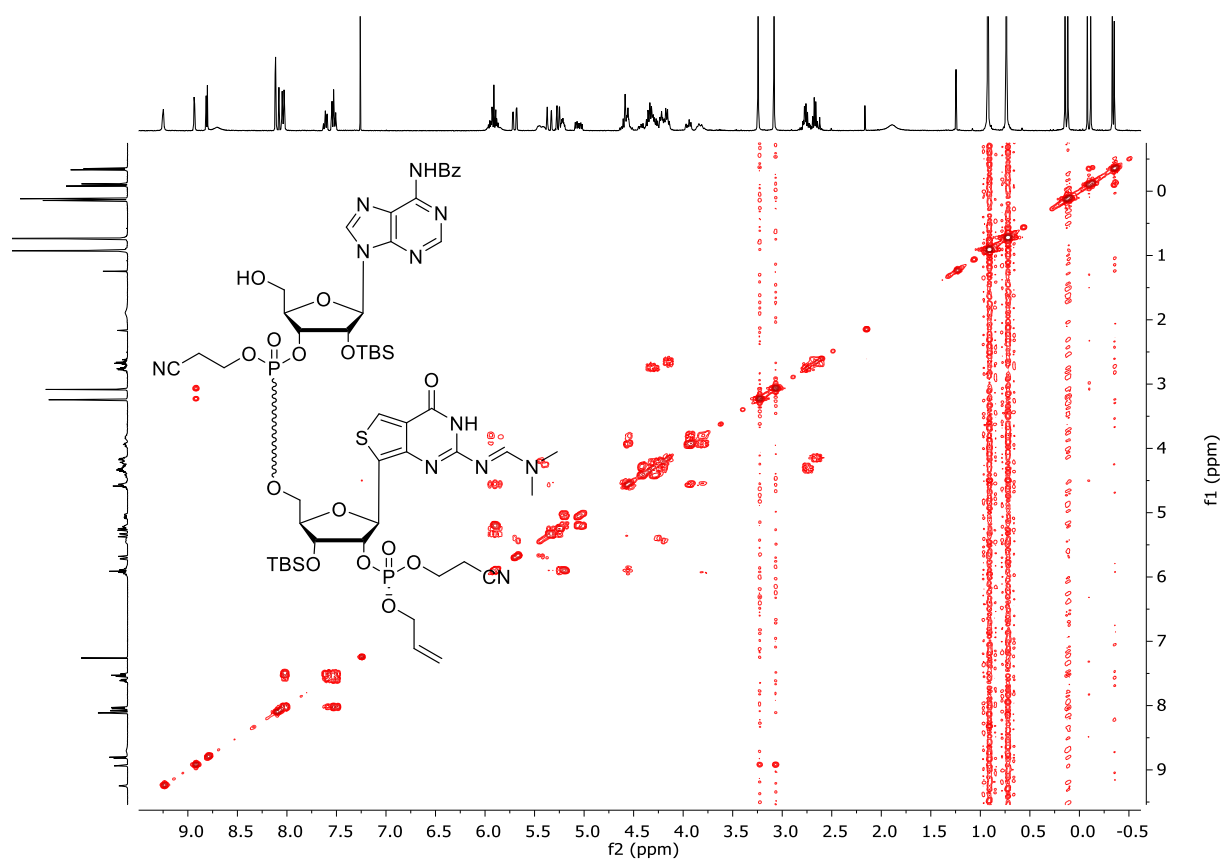
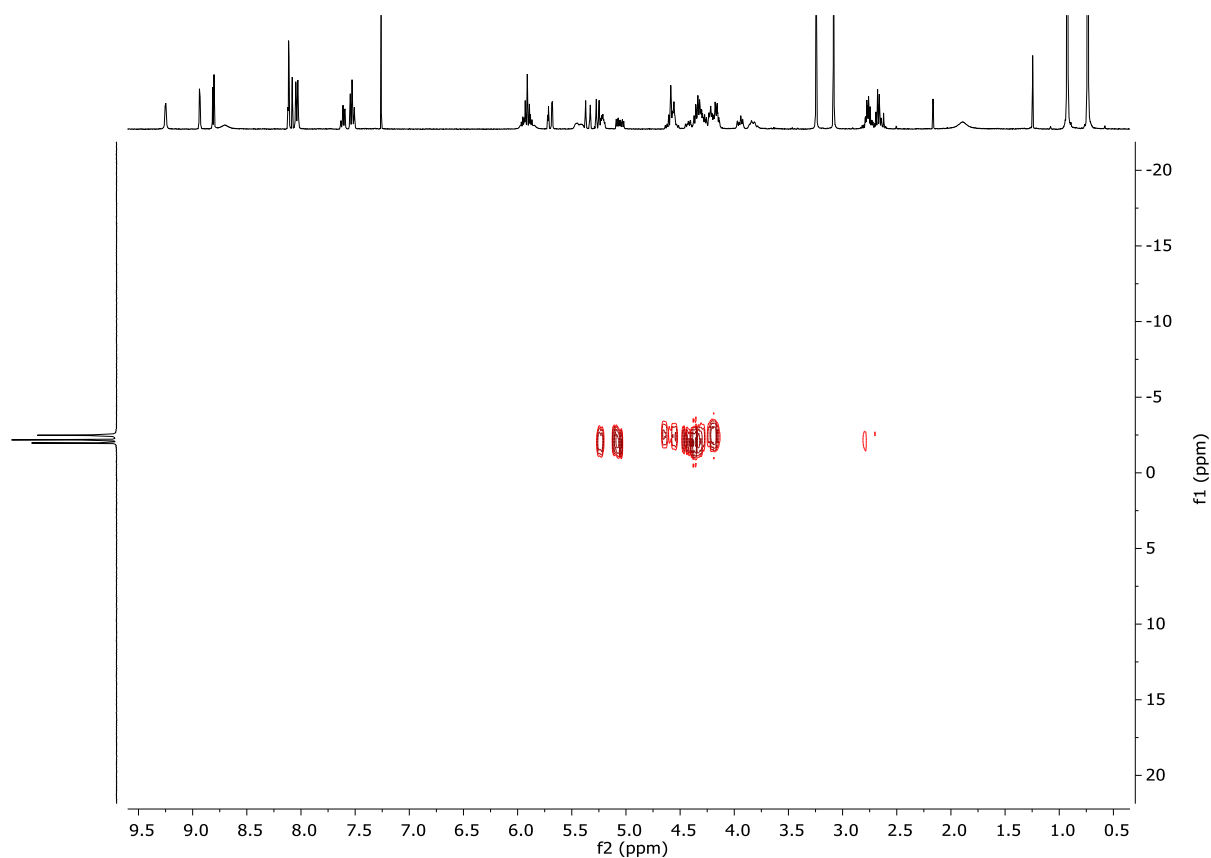


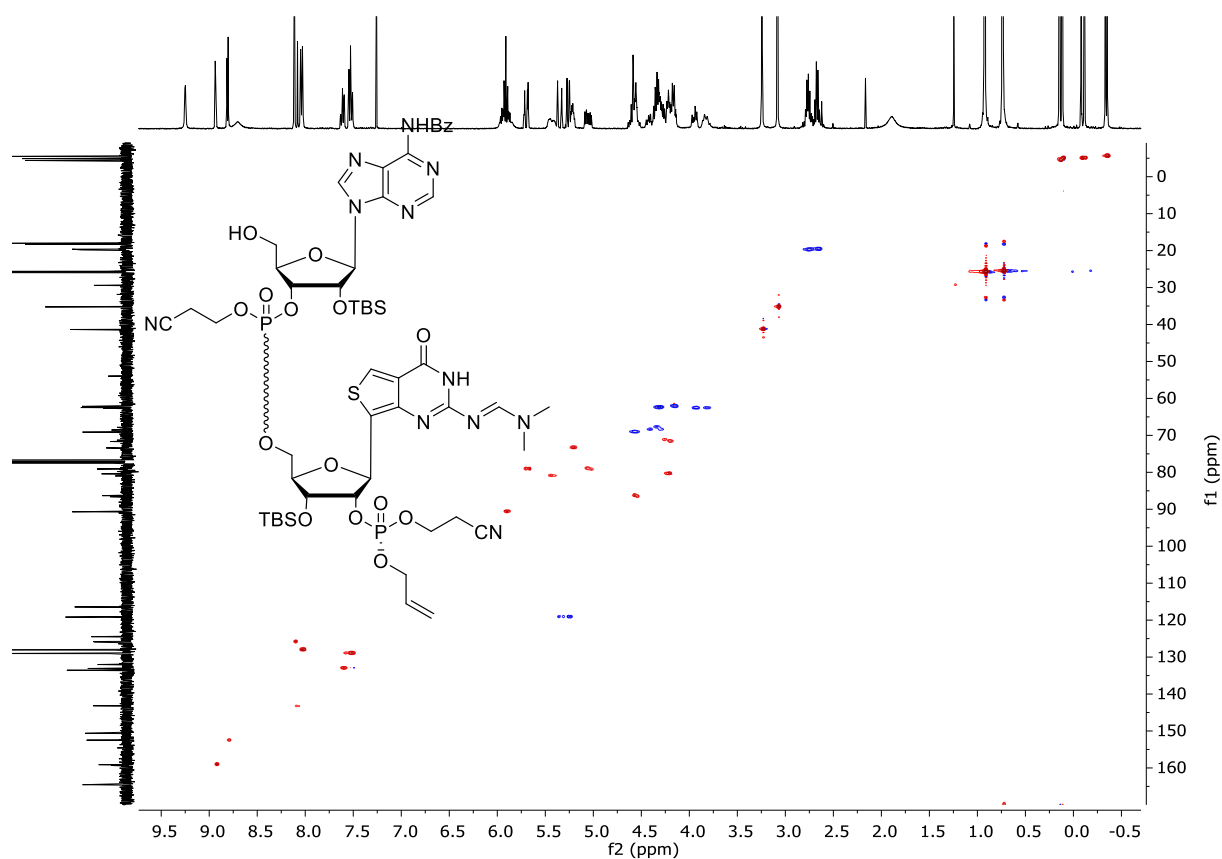
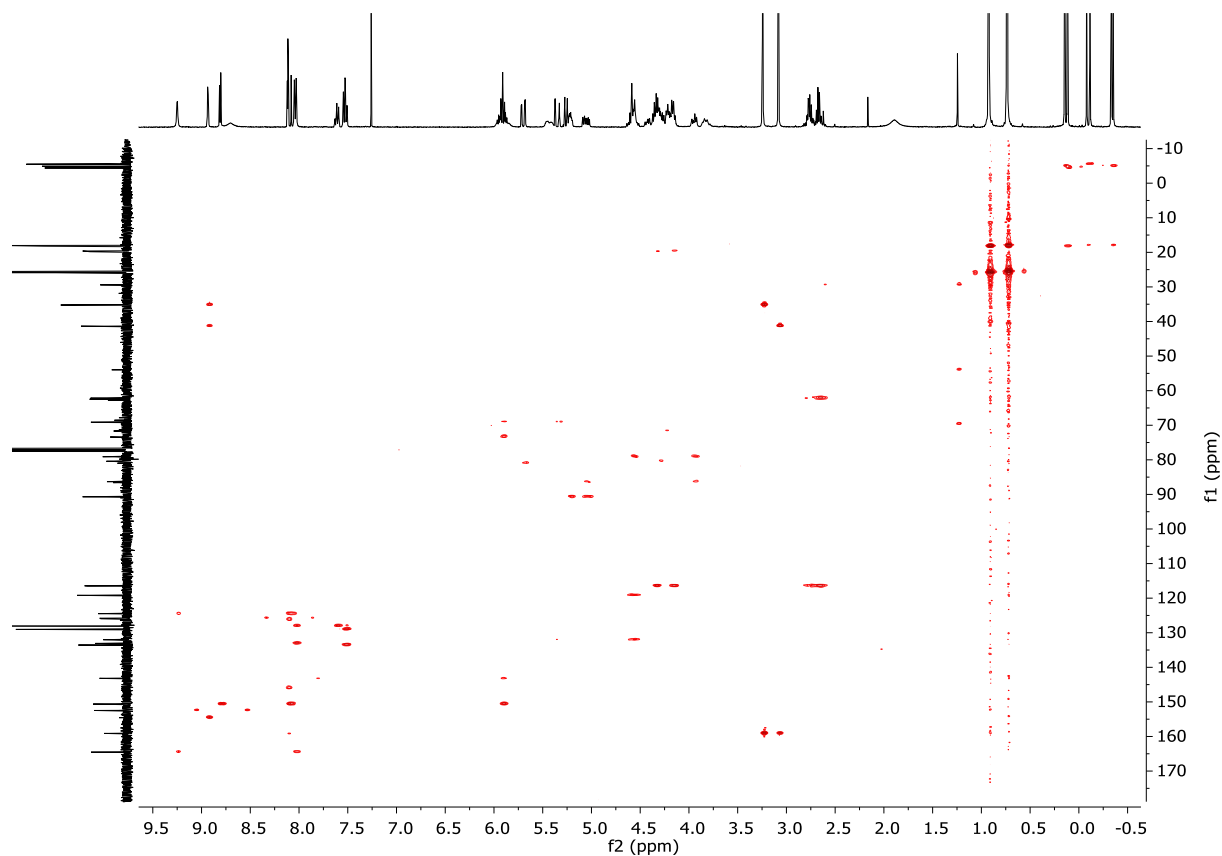
Verbindung **133** (^1H -NMR, 400 MHz, Chloroform- d)

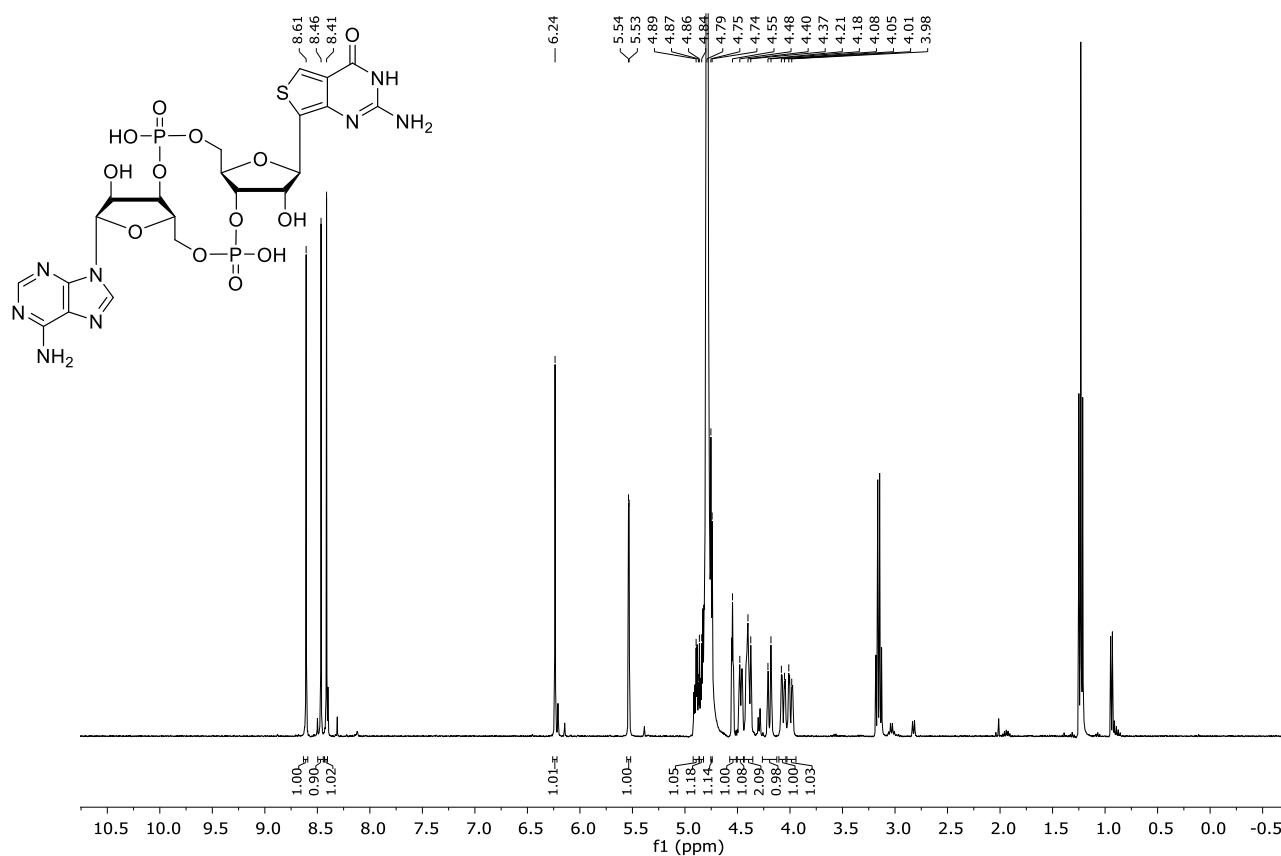
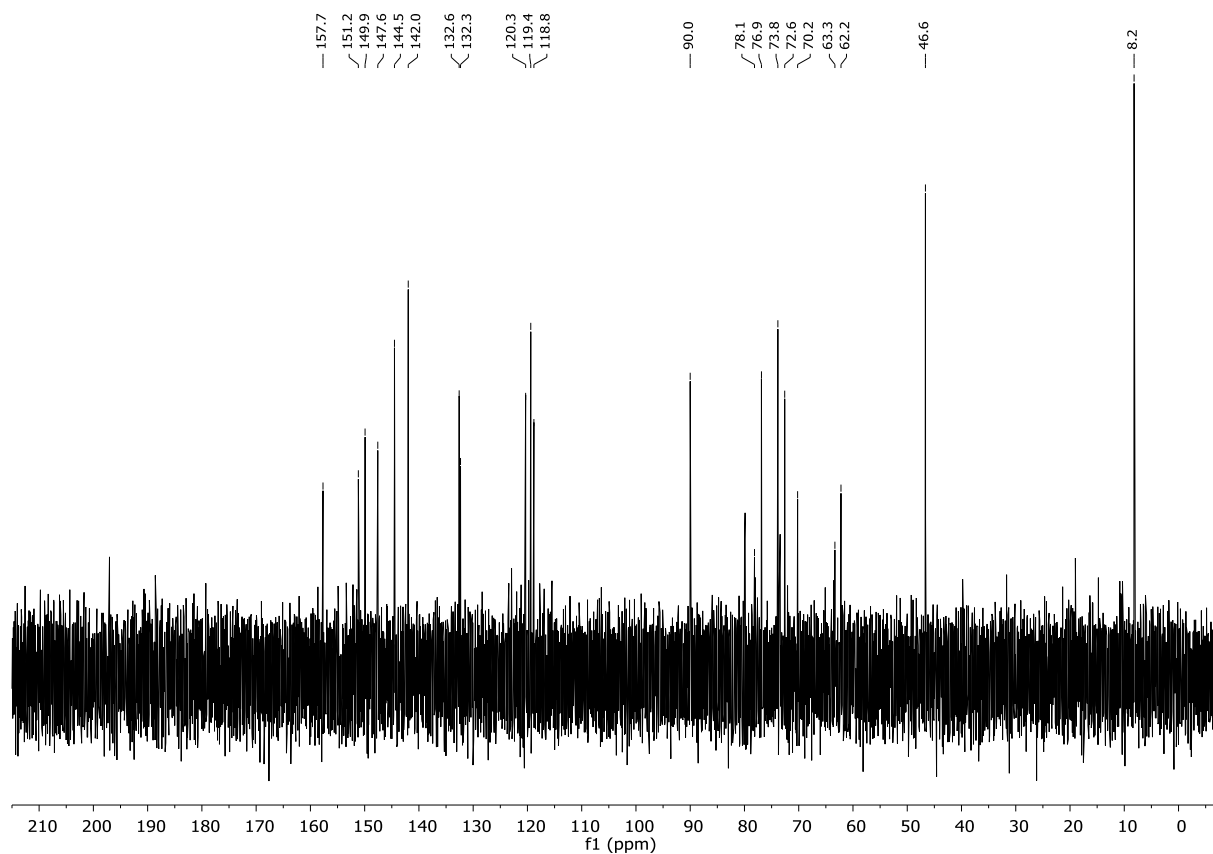
Verbindung **133** (COSY, 400 MHz, Chloroform-*d*)Verbindung **133** (^1H - ^{31}P -NMR, 400 MHz, Chloroform-*d*)

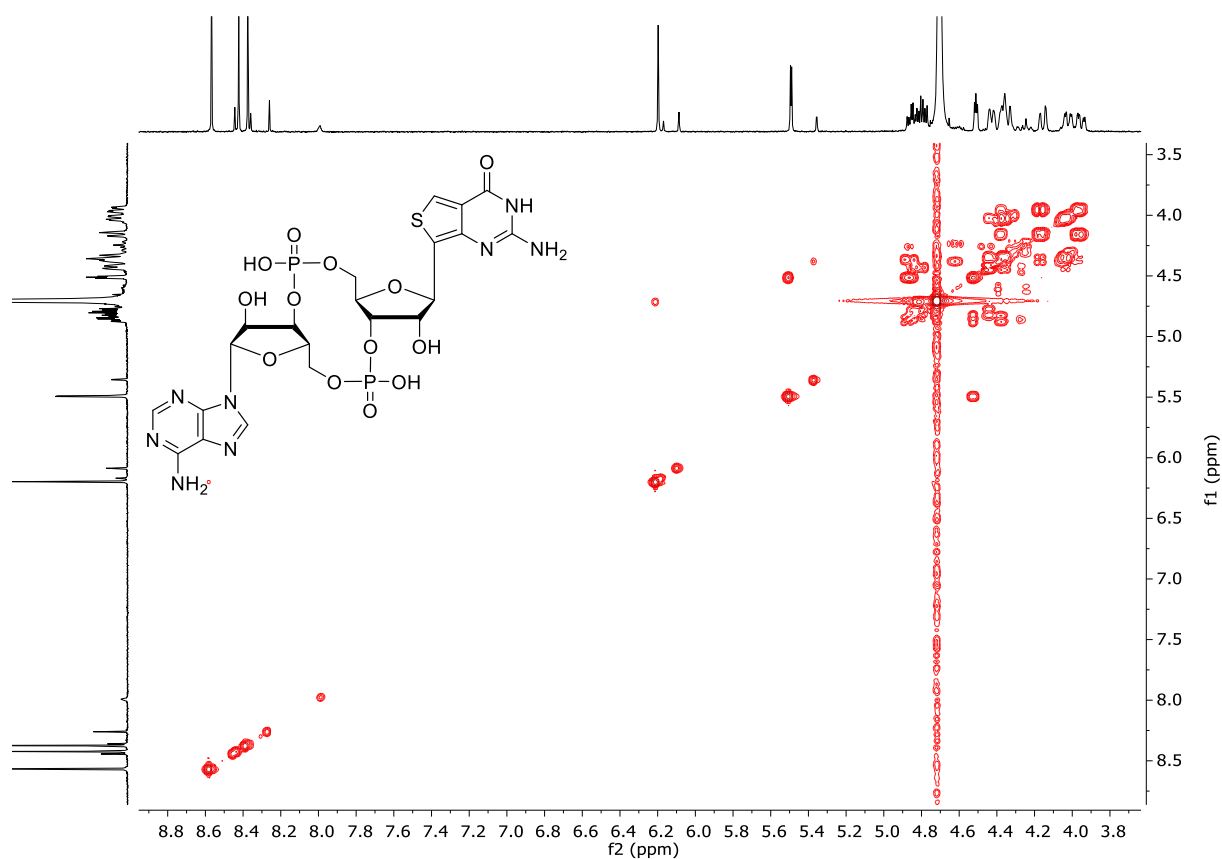
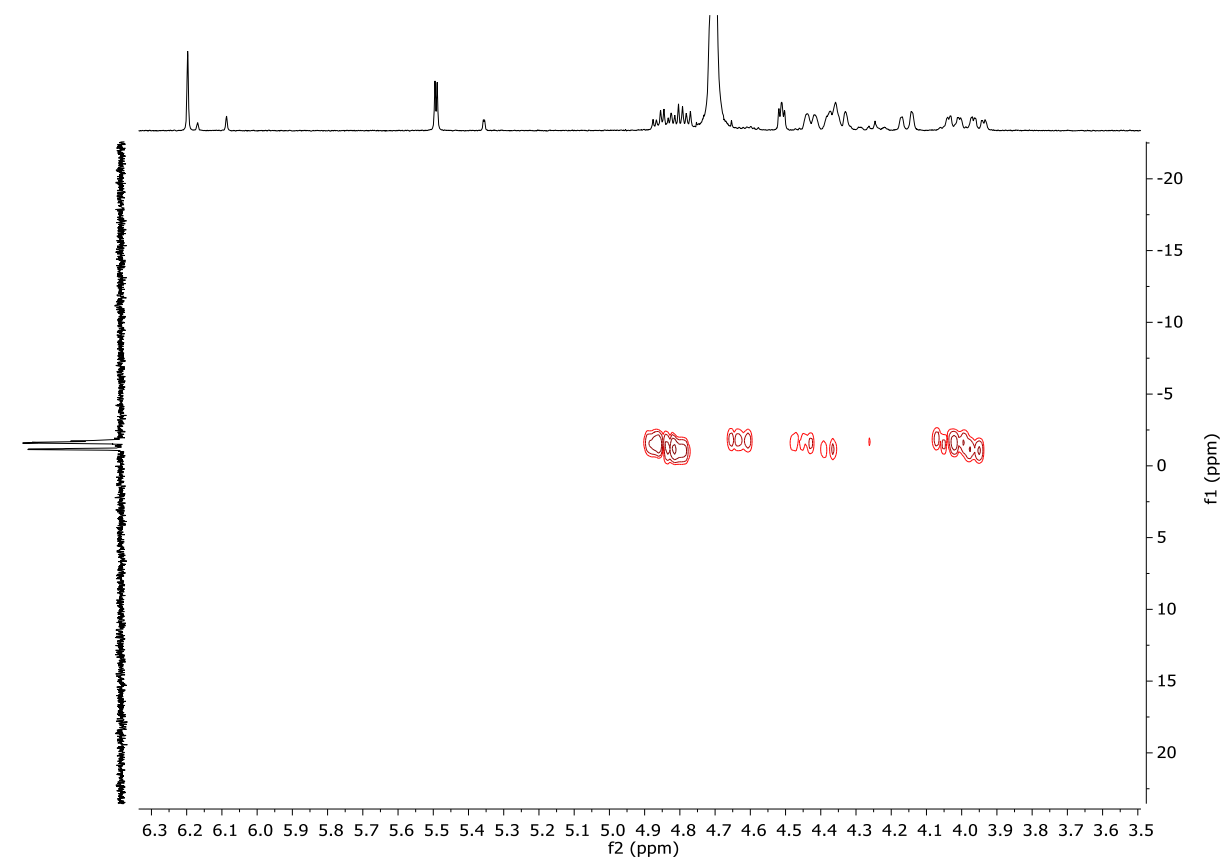
Verbindung **133** (HSQC, 400 MHz, Chloroform-*d*)Verbindung **133** (HMBC, 400 MHz, Chloroform-*d*)

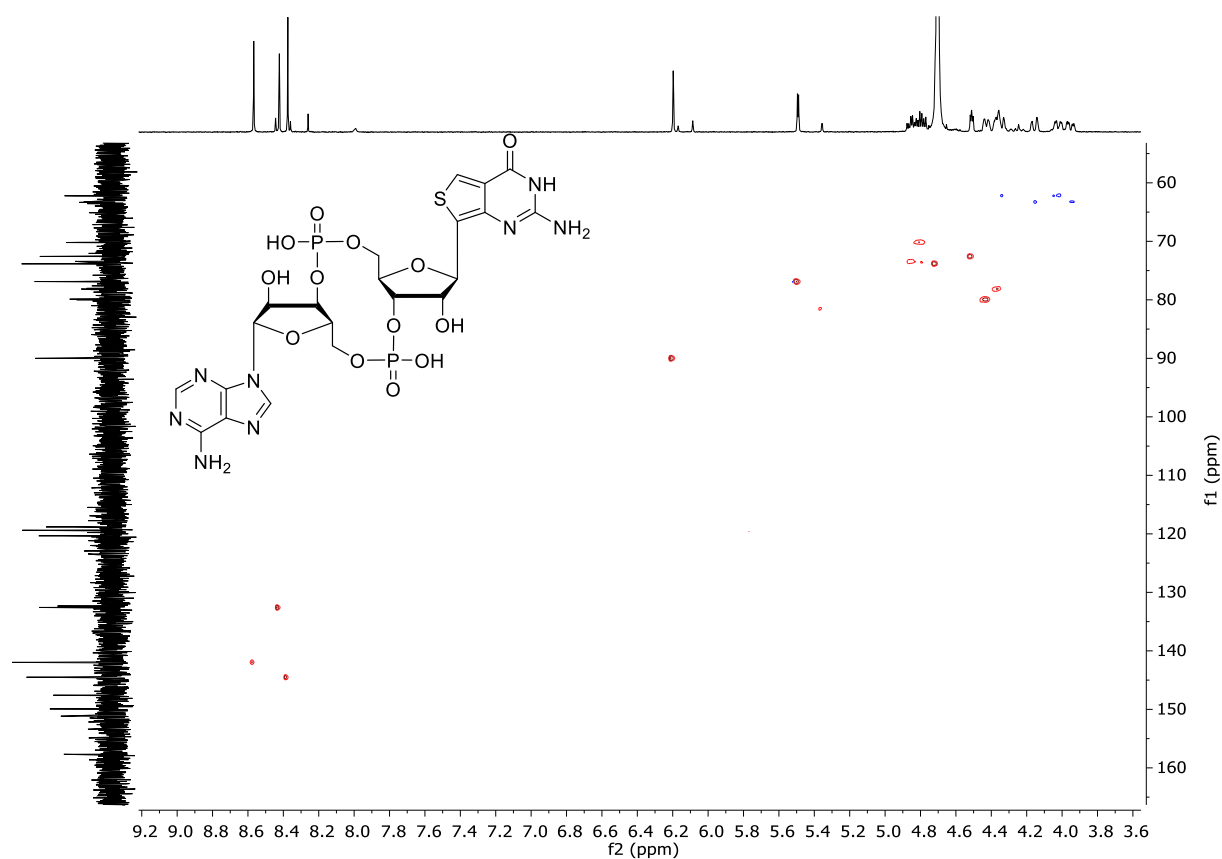
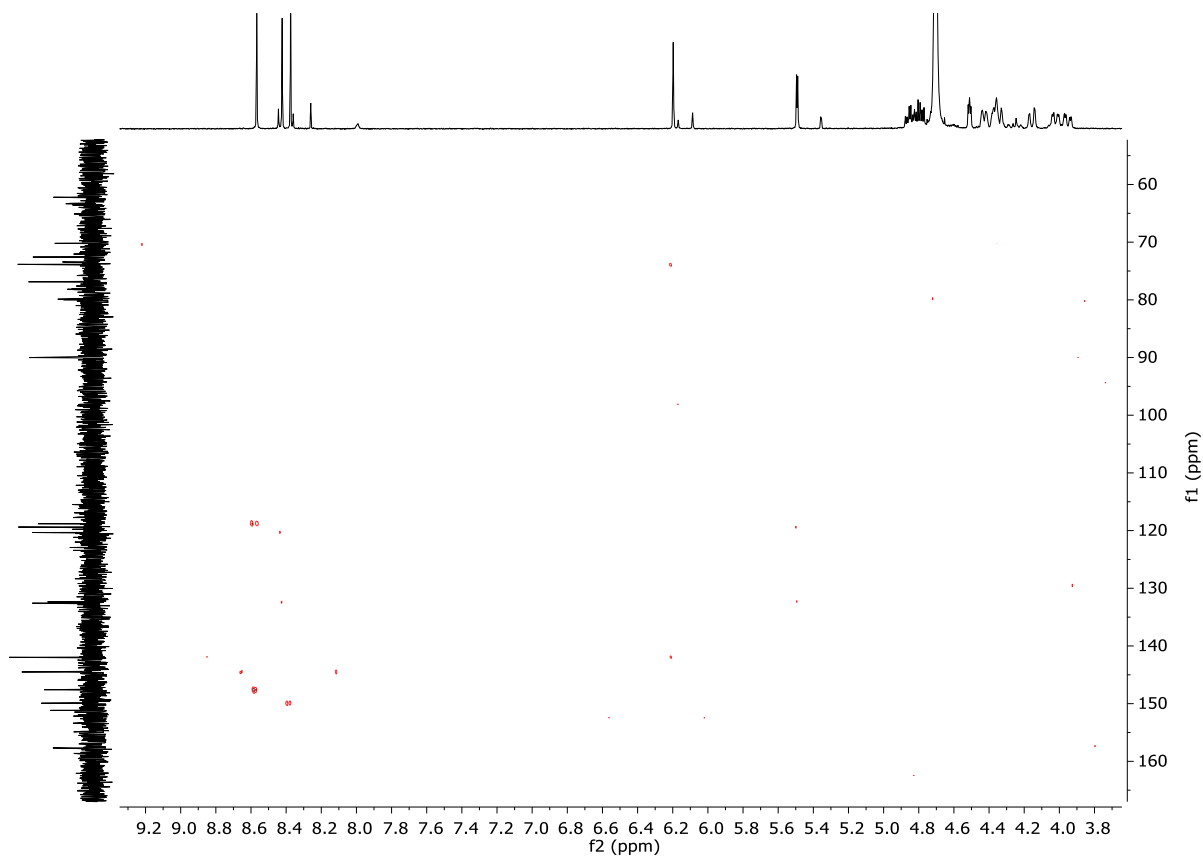
Verbindung **132** (^1H -NMR, 400 MHz, Chloroform- d)Verbindung **132** (^{13}C -NMR, 101 MHz, Chloroform- d)

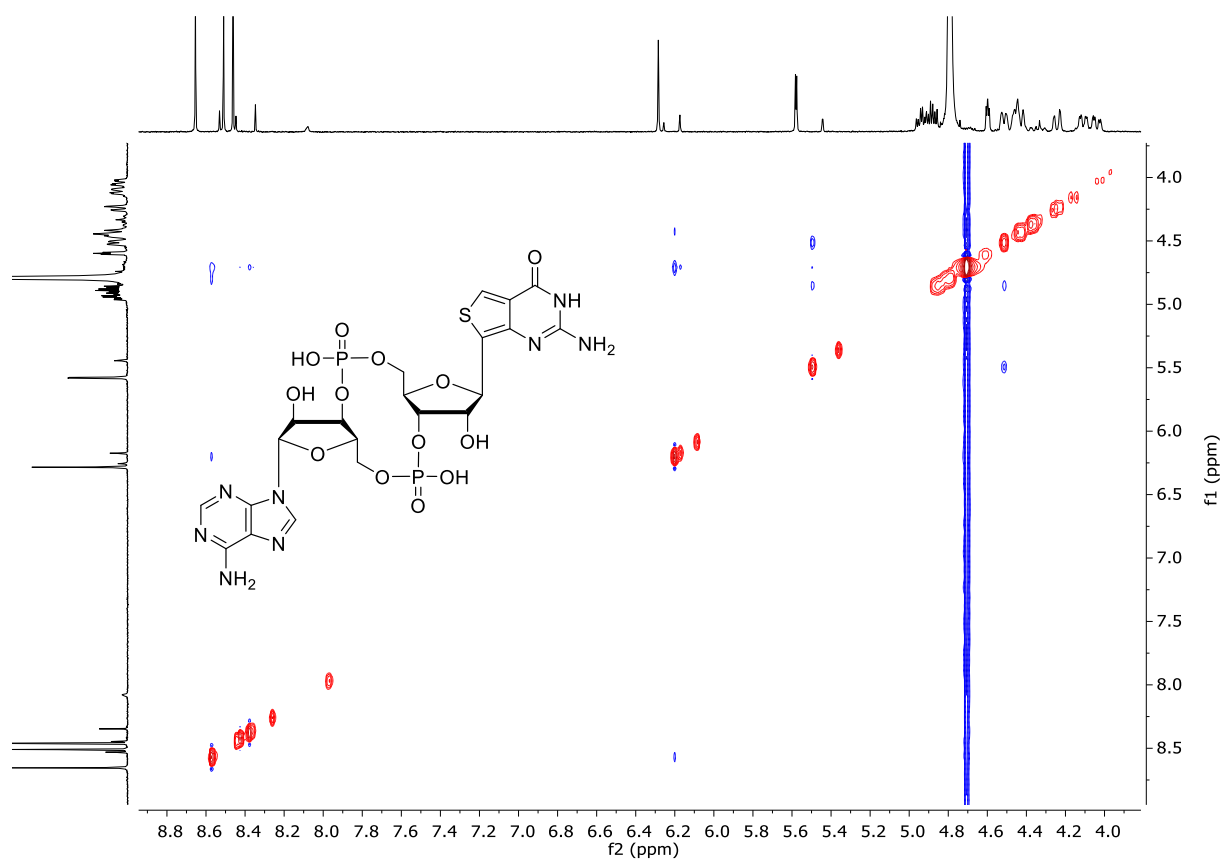
Verbindung **132** (COSY, 400 MHz, Chloroform-*d*)Verbindung **132** (^1H - ^{31}P -NMR, 400 MHz, Chloroform-*d*)

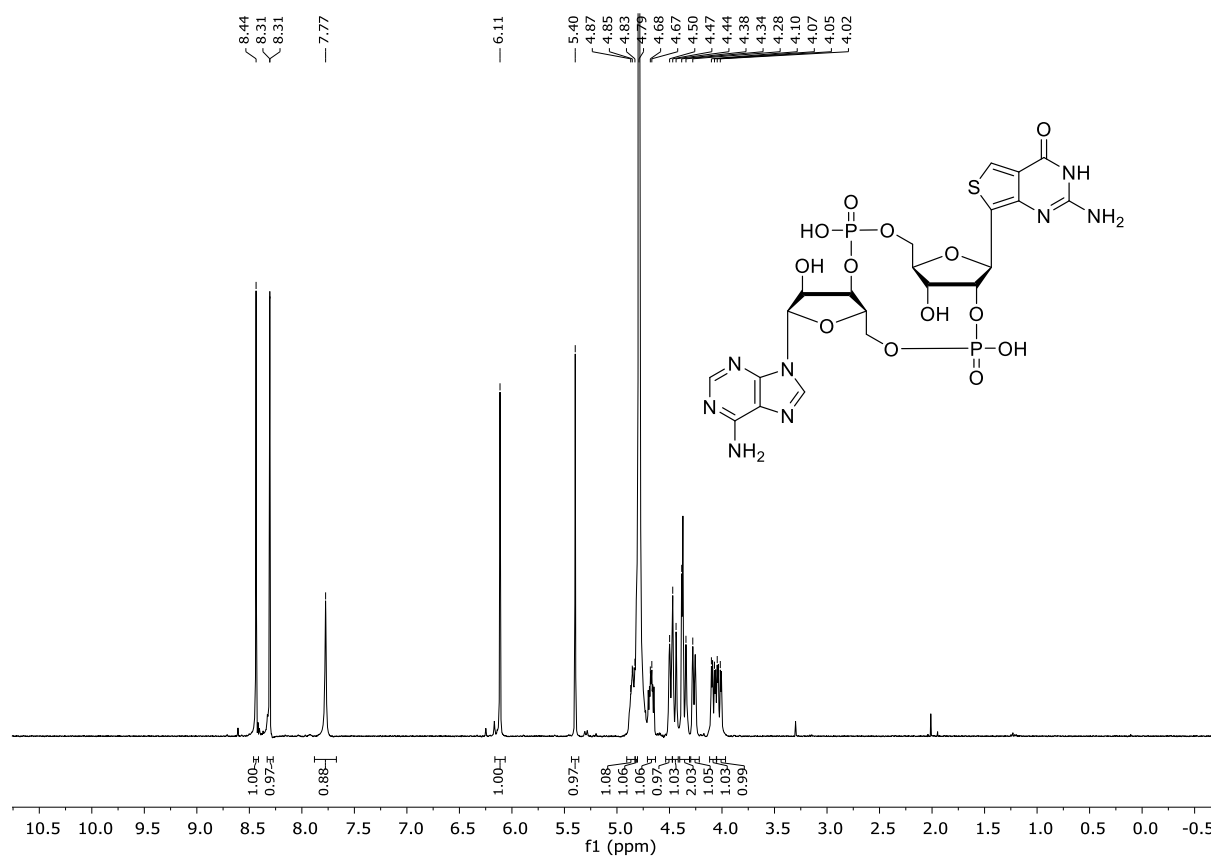
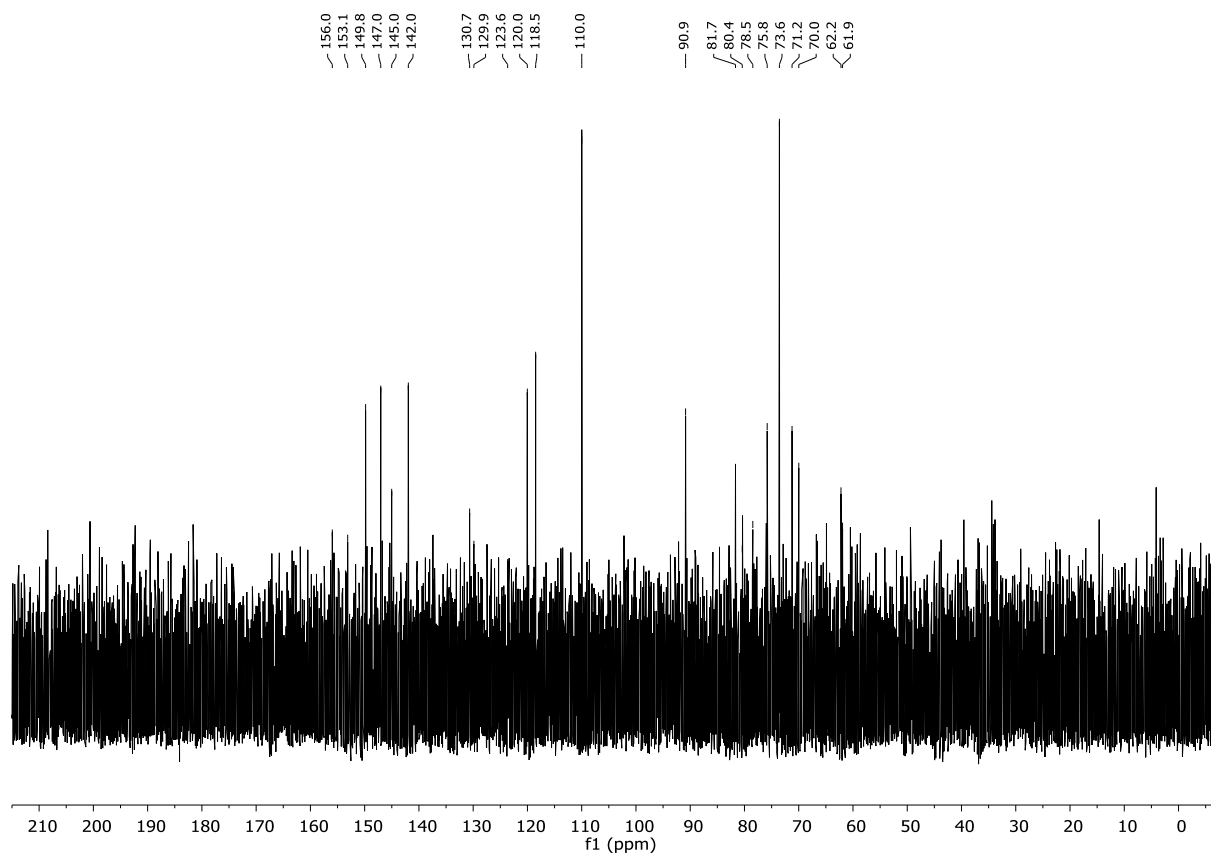
Verbindung **132** (HSQC, 400 MHz, Chloroform-*d*)Verbindung **132** (HMBC, 400 MHz, Chloroform-*d*)

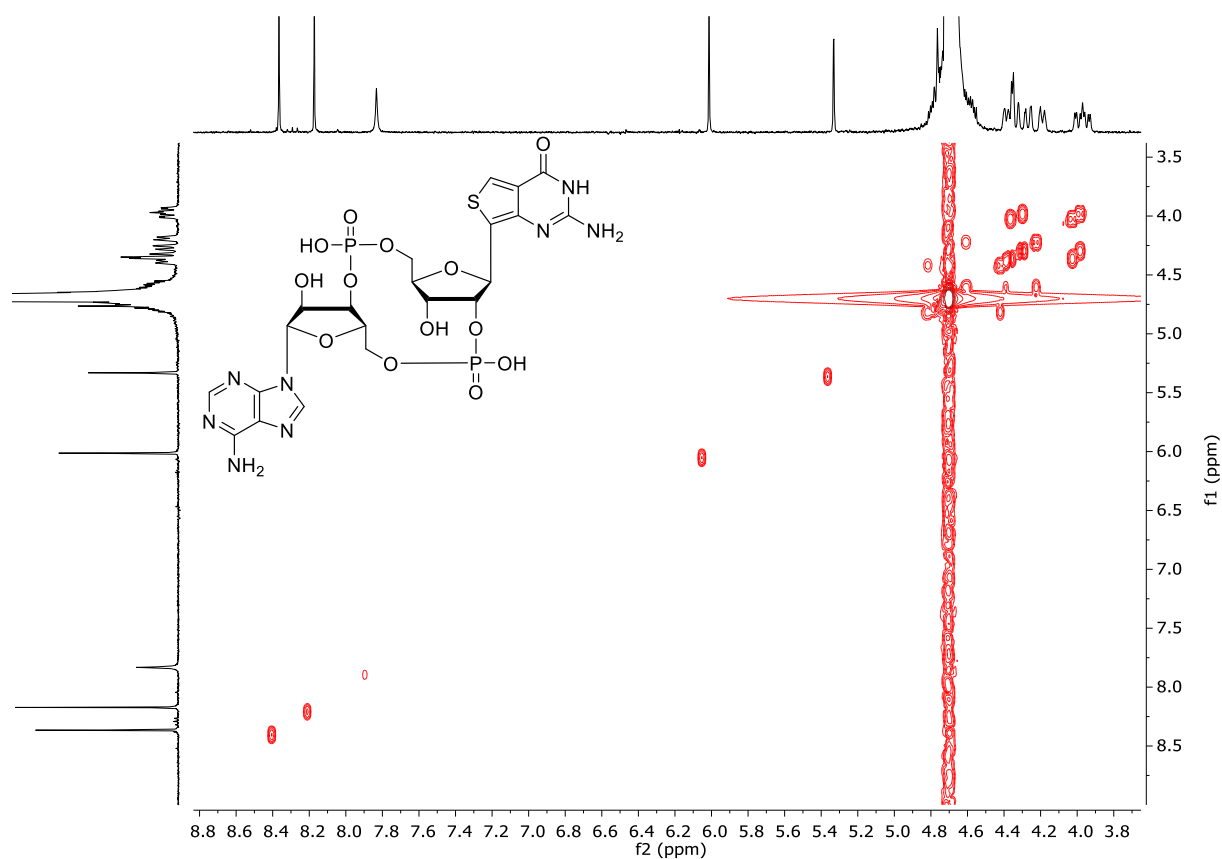
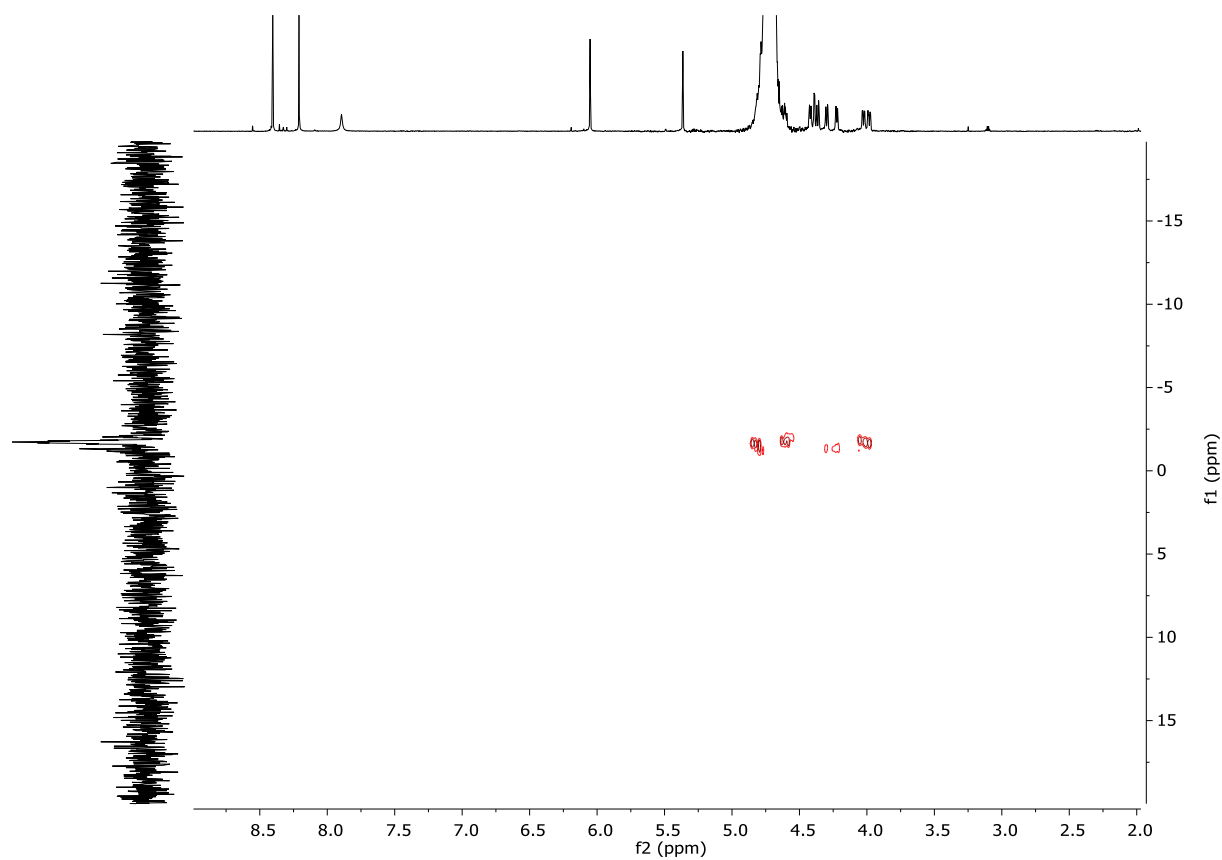
Verbindung **3'3'-TorGAMP (137)** (^1H -NMR, 400 MHz, D_2O)Verbindung **3'3'-TorGAMP (137)** (^{13}C -NMR, 200 MHz, D_2O)

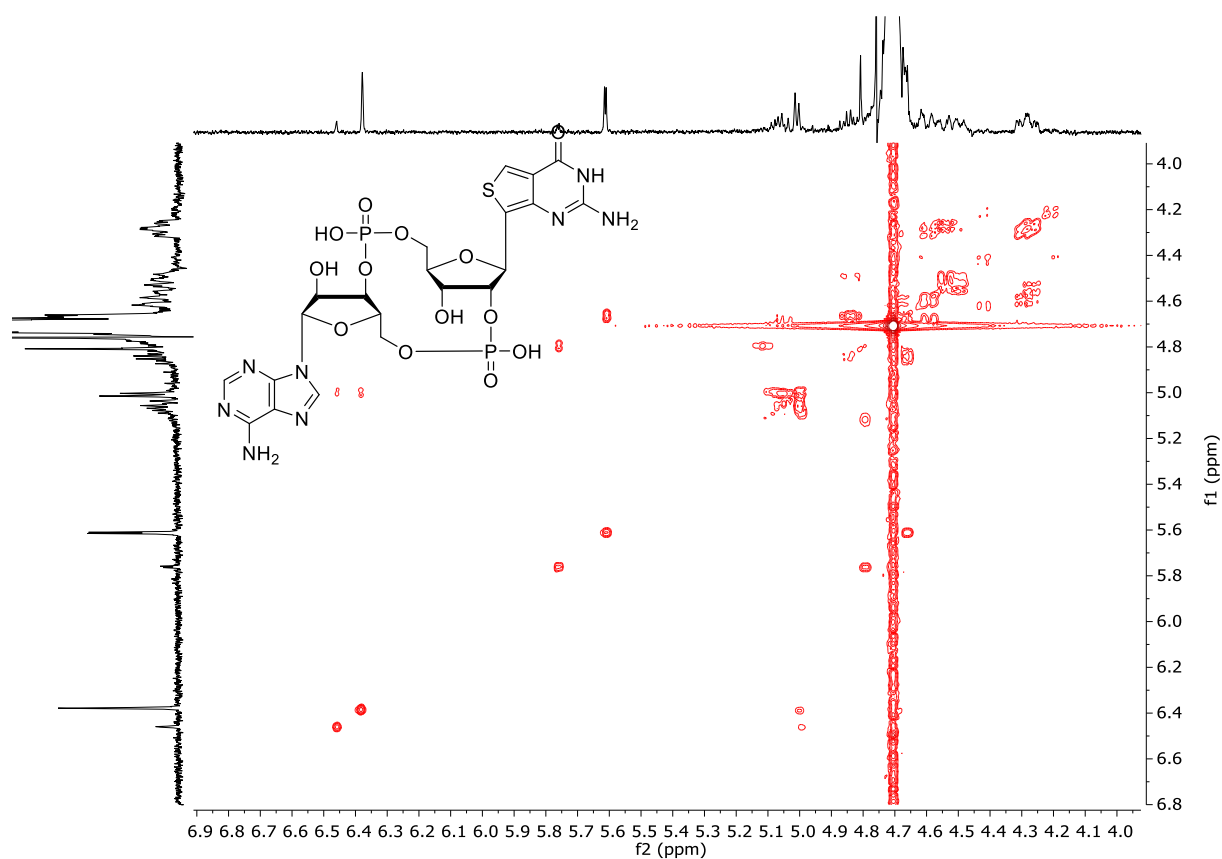
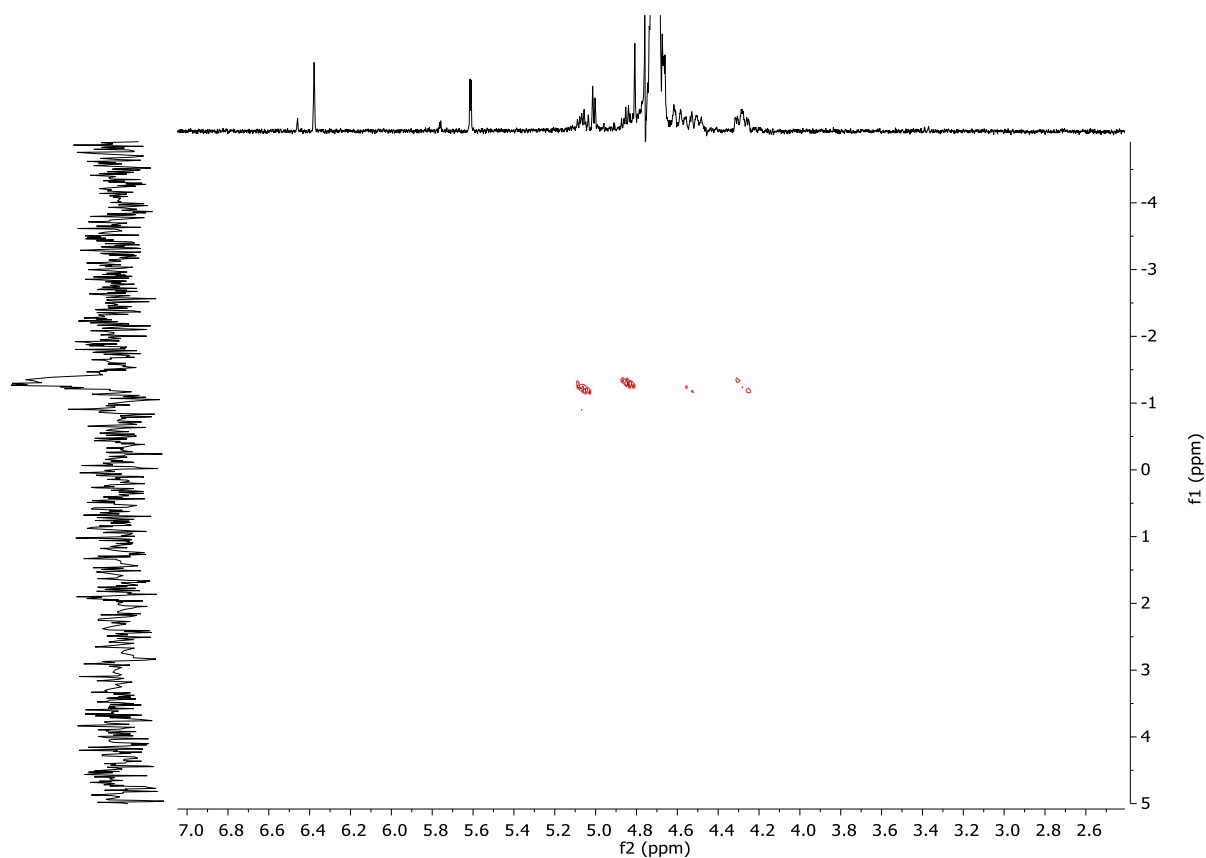
Verbindung **3'3'-TorGAMP (137)** (^1H -NMR, 800 MHz, D_2O)Verbindung **3'3'-TorGAMP (137)** (^1H - ^{31}P -NMR, 400 MHz, D_2O)

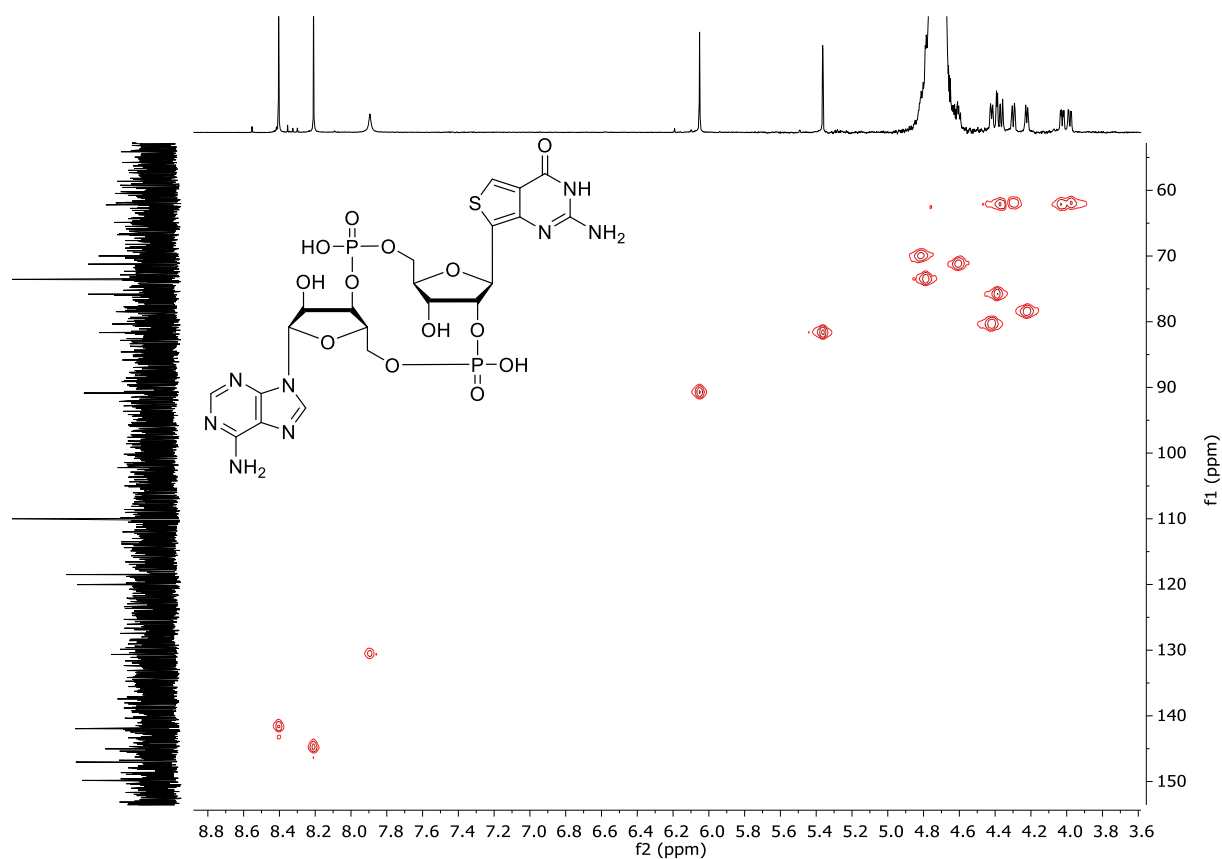
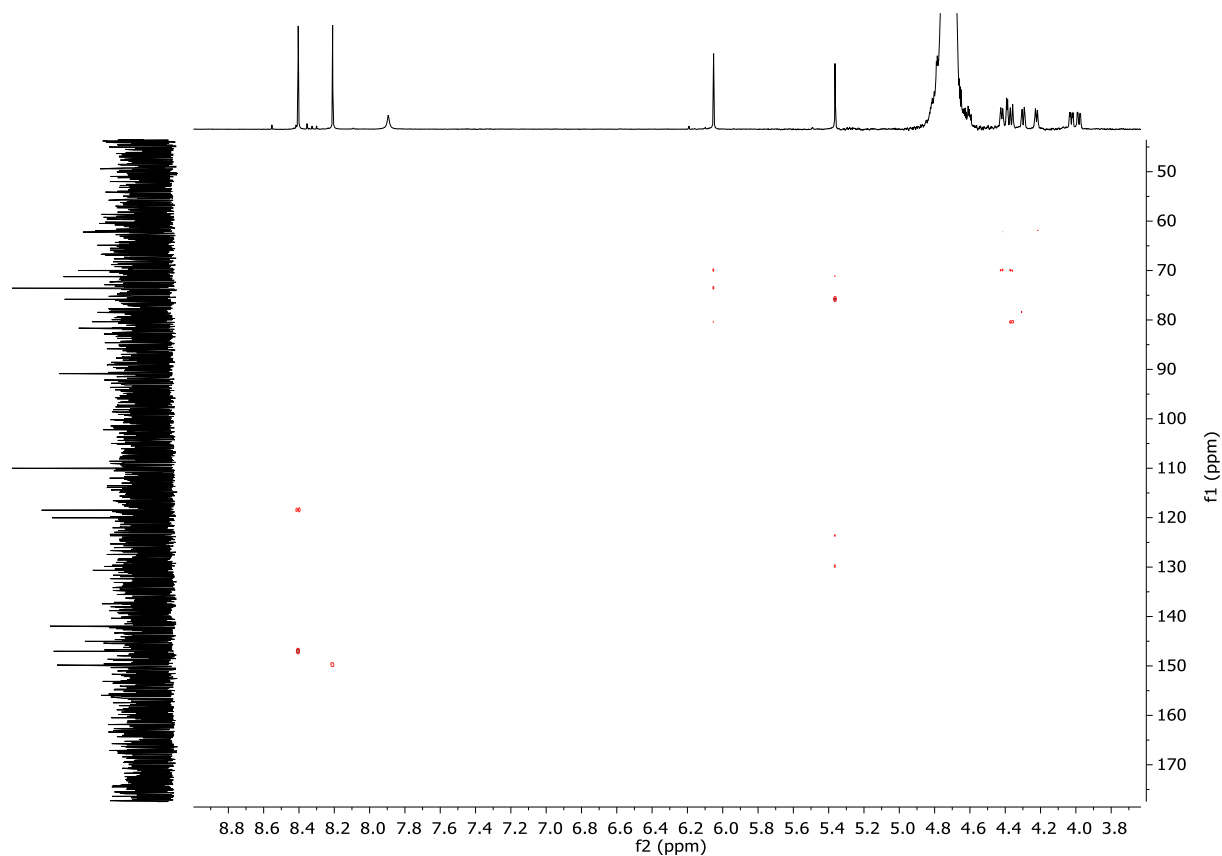
Verbindung **3'3'-TorGAMP (137)** (HSQC, 800 MHz, D_2O)Verbindung **3'3'-TorGAMP (137)** (HMBC, 800 MHz, D_2O)

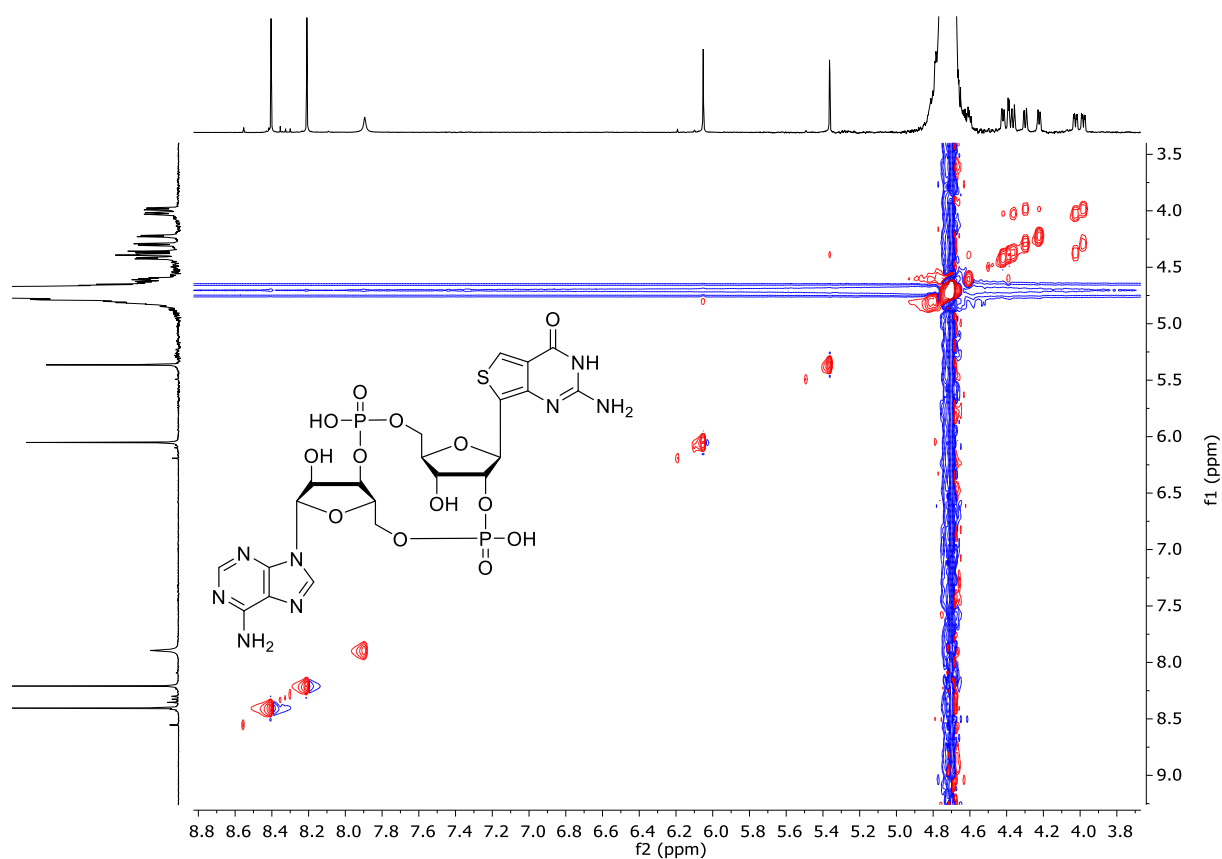
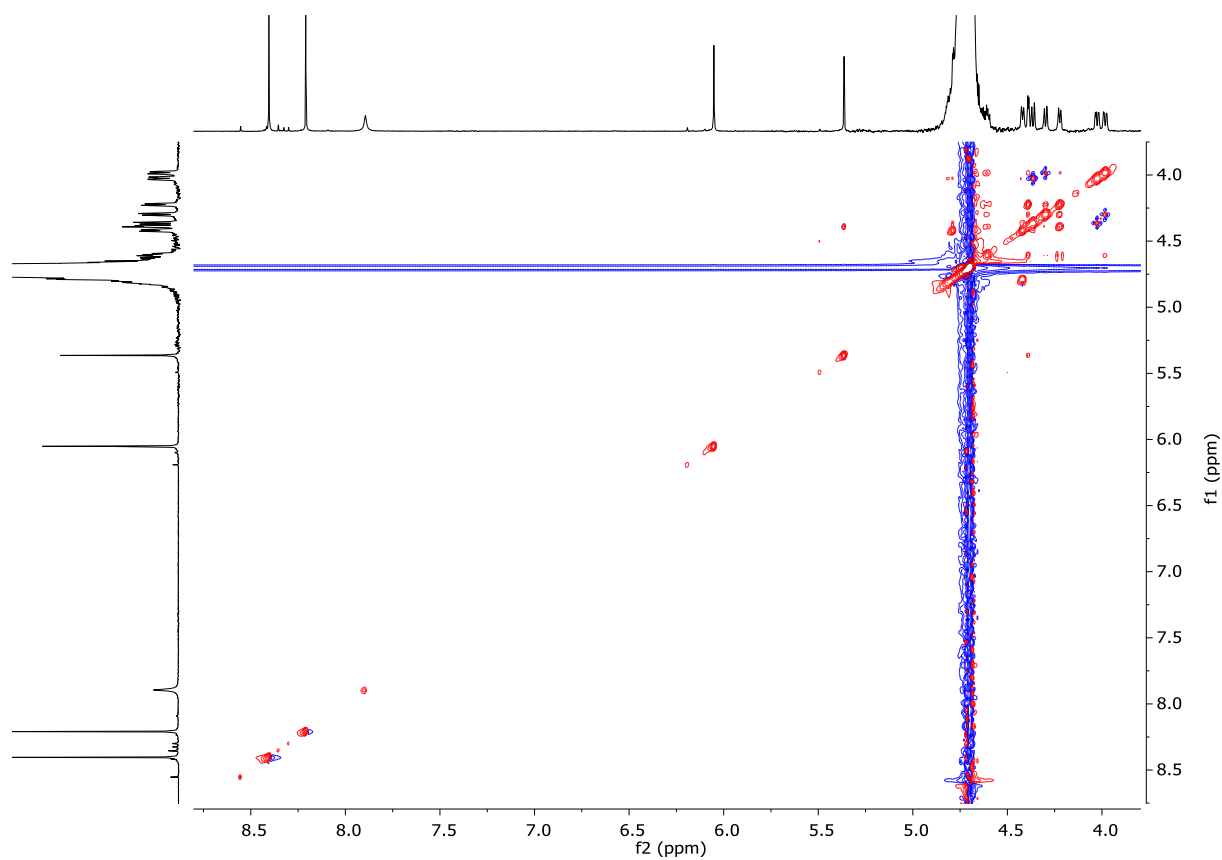
Verbindung **3'3'-TorGAMP (137)** (NOESY, 400 MHz, D_2O)

Verbindung **2'3'-TorGAMP (69)** (^1H -NMR, 400 MHz, D_2O)Verbindung **2'3'-TorGAMP (69)** (^{13}C -NMR, 200 MHz, D_2O)

Verbindung **2'3'-TorGAMP (69)** (COSY, 800 MHz, D_2O)Verbindung **2'3'-TorGAMP (69)** (^1H - ^{31}P -NMR, 400 MHz, D_2O)

Verbindung **2'3'-TorGAMP (69)** (COSY @50°C, 400 MHz, D₂O)Verbindung **2'3'-TorGAMP (69)** (^1H - ^{31}P -HMBC @50°C, 400 MHz, D₂O)

Verbindung **2'3'-TorGAMP (69)** (HSQC, 800 MHz, D_2O)Verbindung **2'3'-TorGAMP (69)** (HMBC, 800 MHz, D_2O)

Verbindung **2'3'-TorGAMP (69)** (NOESY, 800 MHz, D_2O)Verbindung **2'3'-TorGAMP (69)** (TOCSY, 800 MHz, D_2O)

10. Abkürzungen

ABZI	Amidobenzimidazol-Dimer
Ac	Acetyl
ADU-S100	STING-Agonist des Unternehmens Aduro Biotech
AL	Amide Linked
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATP	Adenosintri-phosphat
ATR	Attenuated Total Reflectance
Bn	Benzyl
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
BSA	Bis(trimethylsilyl)acetamid
Bz	Benzoyl
Cbz	Benzyloxycarbonyl
c-di-AMP	Zyklisches Diadenylat
c-di-GMP	Zyklisches Diguanylat
CDN	Zyklisches Dinukleotid
CEDCI	2-Cyanoethyl N,N-Diisopropylchlorophosphoramidit
cGAMP	Zyklisches Guanosin Monophosphat Adenosin Monophosphat
cGAS	Zyklische Guanosin Monophosphat Adenosin Monophosphat Synthase
CMA	10-Carboxymethyl-9-acridanon
COSY	Correlated Spectroscopy
CuAAC	Kupfer-katalysierte Azid Alkin Click Reaktion
d	Doublet
DCM	Dichloromethane
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridine
DMF	N,N'-Dimethylaformamid

DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	4,4'-Dimethoxytrityl
DMXAA	5,6-Dimethylxanthenon-4-essigsäure
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DncV	Dinukleotid Zyklase in <i>Vibrio Cholerae</i>
dpc	Diphenylcarbamoyl
DSF	Differential Scanning Fluorimetry
EC50	mittlere effektive Konzentration
EL	Ester Linked
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENPP1	Ectonucleotide Pyrophosphatase Phosphodiesterase 1
eq.	Equivalent
ESI	Electron spray injection
Et	Ethyl
et al.	Et alii (und andere)
fATP	Fluoreszierendes ATP (mit 2-Aminopurin modifiziert)
fcc	Flash column chromatography (Säulenchromatographie)
fGAMP	Fluoreszierendes 2'3'-cGAMP (mit 2-Aminopurin modifiziert)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HATU	[O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat]
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HNSCC	Plattenepithelkarzinomen in der Kopf-Hals-Region
HPLC	High performance liquid chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence

hSTING	Human Stimulator of Interferon Genes
Hz	Hertz
iBu	Isobutyryl
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
IFN	Interferon
IP3	Inositoltriphosphat
IR	Infrarotspektroskopie
IRF3	Interferon Regulatory Factor 3
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
J	Coupling constant
LCMS	Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry
LPS	Lipopolysaccharid
m	Multiplet
Me	Methyl
mSTING	Murine Stimulator of Interferon Genes
NMO	N-Methylmorpholin-N-oxid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
OAS1	2'-5' Oligoadenylatsynthetase 1
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PDE	Phosphodiesterase
Ph	Phenyl
PRR	Pattern Recognition Receptor
q	Quartet
R	Rest
RECON	Reductase Controlling NF-κB
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reversed Phase

RT	Raumtemperatur
s	Singulet
t	Triplet
T	Temperatur
TBK1	Tank Binding Kinase 1
TBS	tert-Butyldimethylsilyl
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TL	Triazole Linked
TLR	Toll-like Rezeptor
TMSOTf	Trimethylsilyltriflat
TorGAMP	Fluoreszierendes cGAMP (mit Tor-Nukleobase modifiziert)
TPSCI	Triisopropylbenzolsulfonylchlorid
TsCl	4-Toluenesulfonylchlorid
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein
δ	Chemische Verschiebung

LITERATURVERZEICHNIS

11. Literaturverzeichnis

- [1] Medzhitov, R.; Janeway, C. A. *Curr. Opin. Immunol.* **1997**, *9*, 4-9.
- [2] McDade, T. W.; Georgiev, A. V.; Kuzawa, C. W. *Evol. Med. Public Health* **2016**, *2016*, 1-16.
- [3] Schlee, M.; Hartmann, G. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 566-580.
- [4] Akira, S.; Takeda, K. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 499-511.
- [5] Pichlmair, A.; Schulz, O.; Tan, C. P.; Näslund, T. I.; Liljeström, P.; Weber, F.; Reis e Sousa, C. *Science* **2006**, *314*, 997-1001.
- [6] Takeuchi, O.; Akira, S. *Curr. Opin. Immunol.* **2008**, *20*, 17-22.
- [7] Chen, Q.; Sun, L.; Chen, Z. J. *Nat. Immun.* **2016**, *17*, 1142-1149.
- [8] Motwani, M.; Pesiridis, S.; Fitzgerald, K. A. *Nat. Rev. Gen.* **2019**, 657-674.
- [9] Ablasser, A.; Chen, Z. J. *Science* **2019**, *363*, eaat8657.
- [10] Zhu, Y.; An, X.; Zhang, X.; Qiao, Y.; Zheng, T.; Li, X. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 152.
- [11] Barber, G. N. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 760-770.
- [12] Shang, G.; Zhang, C.; Chen, Z. J.; Bai, X.-c.; Zhang, X. *Nature* **2019**, *567*, 389-393.
- [13] Ergun, S. L.; Fernandez, D.; Weiss, T. M.; Li, L. *Cell* **2019**, *178*, 290-301.
- [14] Zhang, C.; Shang, G.; Gui, X.; Zhang, X.; Bai, X.-c.; Chen, Z. J. *Nature* **2019**, *567*, 394-398.
- [15] Gui, X.; Yang, H.; Li, T.; Tan, X.; Shi, P.; Li, M.; Du, F.; Chen, Z. J. *Nature* **2019**, *567*, 262-266.
- [16] Liu, D.; Wu, H.; Wang, C.; Li, Y.; Tian, H.; Siraj, S.; Sehgal, S. A.; Wang, X.; Wang, J.; Shang, Y.; Jiang, Z.; Liu, L.; Chen, Q. *Cell Death Differ.* **2018**, *26*, 1735-1749.
- [17] Sun, F.; Liu, Z.; Yang, Z.; Liu, S.; Guan, W. *Immunol. Res.* **2019**, *67*, 290-296.
- [18] Gulen, M. F.; Koch, U.; Haag, S. M.; Schuler, F.; Apetoh, L.; Villunger, A.; Radtke, F.; Ablasser, A. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 427.
- [19] Ablasser, A.; Schmid-Burgk, J. L.; Hemmerling, I.; Horvath, G. L.; Schmidt, T.; Latz, E.; Hornung, V. *Nature* **2013**, *503*, 530-534.
- [20] Bridgeman, A.; Malfait, J.; Davenne, T.; Partridge, T.; Peng, Y.; Mayer, A.; Dong, T.; Kaeffer, V.; Borrow, P.; Rehwinkel, J. *Science* **2015**, *349*, 1228-1232.
- [21] Carozza, J. A.; Boehnert, V.; Shaw, K. E.; Nguyen, K. C.; Skariah, G.; Brown, J. A.; Rafat, M.; von Eyben, R.; Graves, E. E.; Glenn, J. S.; Smith, M.; Li, L. *bioRxiv* **2019**, 539312.
- [22] Miyakawa, S.; Okui, T.; Shiraishi, T.; Yoshihara, T.; Hirayama, M.; Satomi, Y.; Hamada, T.; Nishida, M.; Akimoto, C.; Sato, S. *J. Immunol. Meth.* **2020**, *480*, 112751.
- [23] Li, L.; Yin, Q.; Kuss, P.; Maliga, Z.; Millán, J. L.; Wu, H.; Mitchison, T. J. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 1043-1048.
- [24] Ritchie, C.; Cordova, A. F.; Hess, G. T.; Bassik, M. C.; Li, L. *Mol. Cell* **2019**, *75*, 372-381.
- [25] Eaglesham, J. B.; Pan, Y.; Kupper, T. S.; Kranzusch, P. J. *Nature* **2019**, *566*, 259-263.
- [26] Zaver, S. A.; Woodward, J. J. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2020**, *63*, 49-56.
- [27] Kato, K.; Nishimasu, H.; Oikawa, D.; Hirano, S.; Hirano, H.; Kasuya, G.; Ishitani, R.; Tokunaga, F.; Nureki, O. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4424.
- [28] Kato, K.; Omura, H.; Ishitani, R.; Nureki, O. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 541-566.

- [29] Fimia, G. M.; Sassone-Corsi, P. *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 1971-1972.
- [30] Berridge, M. J.; Bootman, M. D.; Roderick, H. L. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2003**, *4*, 517-529.
- [31] Berridge, M. J. *Nature* **1993**, *361*, 315-325.
- [32] Krasteva, P. V.; Sondermann, H. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 350-359.
- [33] Tischler, A. D.; Camilli, A. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 5873-5882.
- [34] Witte, C. E.; Whiteley, A. T.; Burke, T. P.; Sauer, J.-D.; Portnoy, D. A.; Woodward, J. J. *mBio* **2013**, *4*, e00282-00213.
- [35] Kulesekara, H.; Lee, V.; Brencic, A.; Liberati, N.; Urbach, J.; Miyata, S.; Lee, D. G.; Neely, A. N.; Hyodo, M.; Hayakawa, Y.; Ausubel, F. M.; Lory, S. *PNAS* **2006**, *103*, 2839-2844.
- [36] Anbazhagan, D.; Mansor, M.; Yan, G. O. S.; Md Yusof, M. Y.; Hassan, H.; Sekaran, S. D. *PLoS One* **2012**, *7*, e36696.
- [37] Camilli, A.; Bassler, B. L. *Science* **2006**, *311*, 1113-1116.
- [38] Nelson, J. W.; Breaker, R. R. *Science Signaling* **2017**, *10*, eaam8812.
- [39] Zheng, J.; Knighton, D. R.; Ten Eyck, L. F.; Karlsson, R.; Xuong, N.; Taylor, S. S.; Sowadski, J. M. *Biochemistry* **1993**, *32*, 2154-2161.
- [40] Bannai, S.; Sheppard, J. R. *Nature* **1974**, *250*, 62-64.
- [41] Ross, P.; Weinhouse, H.; Aloni, Y.; Michaeli, D.; Weinberger-Ohana, P.; Mayer, R.; Braun, S.; de Vroom, E.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H.; Benziman, M. *Nature* **1987**, *325*, 279-281.
- [42] Witte, G.; Hartung, S.; Büttner, K.; Hopfner, K.-P. *Mol. Cell* **2008**, *30*, 167-178.
- [43] Danilchanka, O.; Mekalanos, John J. *Cell* **2013**, *154*, 962-970.
- [44] Gao, P.; Ascano, M.; Wu, Y.; Barchet, W.; Gaffney, Barbara L.; Zillinger, T.; Serganov, Artem A.; Liu, Y.; Jones, Roger A.; Hartmann, G.; Tuschl, T.; Patel, Dinshaw J. *Cell* **2013**, *153*, 1094-1107.
- [45] Ablasser, A.; Goldeck, M.; Cavlar, T.; Deimling, T.; Witte, G.; Röhl, I.; Hopfner, K.-P.; Ludwig, J.; Hornung, V. *Nature* **2013**, *498*, 380-384.
- [46] Wu, J.; Sun, L.; Chen, X.; Du, F.; Shi, H.; Chen, C.; Chen, Z. J. *Science* **2013**, *339*, 826-830.
- [47] Zhang, X.; Shi, H.; Wu, J.; Zhang, X.; Sun, L.; Chen, C.; Chen, Zhijian J. *Mol. Cell* **2013**, *51*, 226-235.
- [48] Nakai, J.; Ohkura, M.; Imoto, K. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 137-141.
- [49] Wu, J.; Sun, L.; Chen, X.; Du, F.; Shi, H.; Chen, C.; Chen, Z. J. *Science* **2012**, 1229963.
- [50] Gao, J.; Tao, J.; Liang, W.; Jiang, Z. *Curr. Opin. Microbiol.* **2016**, *30*, 79-87.
- [51] Davies, Bryan W.; Bogard, Ryan W.; Young, Travis S.; Mekalanos, John J. *Cell* **2012**, *149*, 358-370.
- [52] Li, F.; Cimdins, A.; Rohde, M.; Jänsch, L.; Kaefer, V.; Nimtz, M.; Römling, U. *mBio* **2019**, *10*, e02492-02418.
- [53] Sun, L.; Wu, J.; Du, F.; Chen, X.; Chen, Z. J. *Science* **2013**, *339*, 786-791.
- [54] Shi, H.; Wu, J.; Chen, Z. J.; Chen, C. *PNAS* **2015**, *112*, 8947-8952.
- [55] Che, X.; Zhang, J.; Quan, H.; Yang, L.; Gao, Y. Q. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122*, 1862-1868.
- [56] Malathi, K.; Paranjape, J. M.; Bulanova, E.; Shim, M.; Guenther-Johnson, J. M.; Faber, P. W.; Eling, T. E.; Williams, B. R. G.; Silverman, R. H. *PNAS* **2005**, *102*, 14533-14538.
- [57] Vachon, V. K.; Calderon, B. M.; Conn, G. L. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 544-552.

- [58] Mozzi, A.; Pontremoli, C.; Forni, D.; Clerici, M.; Pozzoli, U.; Bresolin, N.; Cagliani, R.; Sironi, M. *Genome Biol. Evol.* **2015**, *7*, 1016-1032.
- [59] Whiteley, A. T.; Eaglesham, J. B.; de Oliveira Mann, C. C.; Morehouse, B. R.; Lowey, B.; Nieminen, E. A.; Danilchanka, O.; King, D. S.; Lee, A. S. Y.; Mekalanos, J. J.; Kranzusch, P. J. *Nature* **2019**, *567*, 194-199.
- [60] Wang, C.; Sinn, M.; Stifel, J.; Heiler, A. C.; Sommershof, A.; Hartig, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 16154-16160.
- [61] McFarland, A. P.; Luo, S.; Ahmed-Qadri, F.; Zuck, M.; Thayer, E. F.; Goo, Y. A.; Hybiske, K.; Tong, L.; Woodward, J. J. *Immunity* **2017**, *46*, 433-445.
- [62] Farkona, S.; Diamandis, E. P.; Blasutig, I. M. *BMC Medicine* **2016**, *14*, 73.
- [63] Li, T.; Chen, Z. J. *J. Exp. Med.* **2018**, *215*, 1287-1299.
- [64] Ribas, A.; Wolchok, J. D. *Science* **2018**, *359*, 1350-1355.
- [65] Lee-Kirsch, M. A. *Annu. Rev. Med.* **2017**, *68*, 297-315.
- [66] Mills, R. E.; Walter, K.; Stewart, C.; Handsaker, R. E.; Chen, K.; Alkan, C.; Abyzov, A.; Yoon, S. C.; Ye, K.; Cheetham, R. K.; Chinwalla, A.; Conrad, D. F.; Fu, Y.; Grubert, F.; Hajirasouliha, I.; Hormozdiani, F.; Iakoucheva, L. M.; Iqbal, Z.; Kang, S.; Kidd, J. M.; Konkel, M. K.; Korn, J.; Khurana, E.; Kural, D.; Lam, H. Y. K.; Leng, J.; Li, R.; Li, Y.; Lin, C.-Y.; Luo, R.; Mu, X. J.; Nemesh, J.; Peckham, H. E.; Rausch, T.; Scally, A.; Shi, X.; Stromberg, M. P.; Stütz, A. M.; Urban, A. E.; Walker, J. A.; Wu, J.; Zhang, Y.; Zhang, Z. D.; Batzer, M. A.; Ding, L.; Marth, G. T.; McVean, G.; Sebat, J.; Snyder, M.; Wang, J.; Ye, K.; Eichler, E. E.; Gerstein, M. B.; Hurles, M. E.; Lee, C.; McCarroll, S. A.; Korb, J. O.; Genomes, P. *Nature* **2011**, *470*, 59-65.
- [67] Yi, G.; Brendel, V. P.; Shu, C.; Li, P.; Palanathan, S.; Cheng Kao, C. *PLoS One* **2013**, *8*, e77846.
- [68] Liu, Y.; Jesus, A. A.; Marrero, B.; Yang, D.; Ramsey, S. E.; Montealegre Sanchez, G. A.; Tenbrock, K.; Wittkowski, H.; Jones, O. Y.; Kuehn, H. S.; Lee, C.-C. R.; DiMattia, M. A.; Cowen, E. W.; Gonzalez, B.; Palmer, I.; DiGiovanna, J. J.; Biancotto, A.; Kim, H.; Tsai, W. L.; Trier, A. M.; Huang, Y.; Stone, D. L.; Hill, S.; Kim, H. J.; St. Hilaire, C.; Gurprasad, S.; Plass, N.; Chapelle, D.; Horkayne-Szakaly, I.; Foell, D.; Barysenka, A.; Candotti, F.; Holland, S. M.; Hughes, J. D.; Mehmet, H.; Issekutz, A. C.; Raffeld, M.; McElwee, J.; Fontana, J. R.; Minniti, C. P.; Moir, S.; Kastner, D. L.; Gadina, M.; Steven, A. C.; Wingfield, P. T.; Brooks, S. R.; Rosenzweig, S. D.; Fleisher, T. A.; Deng, Z.; Boehm, M.; Paller, A. S.; Goldbach-Mansky, R. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 507-518.
- [69] Crow, Y. J.; Hayward, B. E.; Parmar, R.; Robins, P.; Leitch, A.; Ali, M.; Black, D. N.; van Bokhoven, H.; Brunner, H. G.; Hamel, B. C.; Corry, P. C.; Cowan, F. M.; Frints, S. G.; Klepper, J.; Livingston, J. H.; Lynch, S. A.; Massey, R. F.; Meritet, J. F.; Michaud, J. L.; Ponsot, G.; Voit, T.; Lebon, P.; Bonthron, D. T.; Jackson, A. P.; Barnes, D. E.; Lindahl, T. *Nat. Gen.* **2006**, *38*, 917-920.
- [70] Crow, Y. J.; Manel, N. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 429-440.
- [71] Gladman, D. D.; Ibañez, D.; Urowitz, M. B. *J. Rheumatol.* **2002**, *29*, 288-291.
- [72] Rodero, M. P.; Crow, Y. J. *PNAS* **2015**, *112*, 12903-12904.
- [73] Gao, D.; Li, T.; Li, X.-D.; Chen, X.; Li, Q.-Z.; Wight-Carter, M.; Chen, Z. J. *PNAS* **2015**, *112*, E5699-E5705.
- [74] Ishikawa, H.; Barber, G. N. *Nature* **2008**, *455*, 674-678.
- [75] Su, T.; Zhang, Y.; Valerie, K.; Wang, X.-Y.; Lin, S.; Zhu, G. *Theranostics* **2019**, 7759-7771.
- [76] DeVita, V. T.; Chu, E. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 8643-8653.
- [77] Kaufmann, S. H.; Earnshaw, W. C. *Exp. Cell Res.* **2000**, *256*, 42-49.
- [78] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3-25.

- [79] Csermely, P.; Korcsmáros, T.; Kiss, H. J. M.; London, G.; Nussinov, R. *Pharmakol. Ther.* **2013**, *138*, 333-408.
- [80] Wu, J.-J.; Zhao, L.; Hu, H.-G.; Li, W.-H.; Li, Y.-M. *Med. Res. Rev.* **2019**, 1-25.
- [81] Fu, J.; Kanne, D. B.; Leong, M.; Glickman, L. H.; McWhirter, S. M.; Lemmens, E.; Mechette, K.; Leong, J. J.; Lauer, P.; Liu, W.; Sivick, K. E.; Zeng, Q.; Soares, K. C.; Zheng, L.; Portnoy, D. A.; Woodward, J. J.; Pardoll, D. M.; Dubensky, T. W.; Kim, Y. *Science Transl. Med.* **2015**, *7*, 283ra252-283ra252.
- [82] Corrales, L.; McWhirter, S. M.; Dubensky, T. W., Jr.; Gajewski, T. F. *J. Clin. Invest.* **2016**, *126*, 2404-2411.
- [83] Feng, X.; Liu, D.; Li, Z.; Bian, J. *Drug Discov. Today* **2020**, *25*, 230-237.
- [84] Huck, B. R.; Kötzner, L.; Urbahns, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 4412-4428.
- [85] Harrington, K. J.; Brody, J.; Ingham, M.; Strauss, J.; Cemerski, S.; Wang, M.; Tse, A.; Khilnani, A.; Marabelle, A.; Golan, T. *Ann. Oncol.* **2018**, *29*.
- [86] Lioux, T.; Mauny, M.-A.; Lamoureux, A.; Bascoul, N.; Hays, M.; Vernejoul, F.; Baudru, A.-S.; Boularan, C.; Lopes-Vicente, J.; Qushair, G.; Tiraby, G. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10253-10267.
- [87] Corrales, L.; Glickman, Laura H.; McWhirter, Sarah M.; Kanne, David B.; Sivick, Kelsey E.; Katibah, George E.; Woo, S.-R.; Lemmens, E.; Banda, T.; Leong, Justin J.; Metchette, K.; Dubensky, Thomas W.; Gajewski, Thomas F. *Cell Rep.* **2015**, *11*, 1018-1030.
- [88] Ching, L. M.; Cao, Z.; Kieda, C.; Zwain, S.; Jameson, M. B.; Baguley, B. C. *Br. J. Canc.* **2002**, *86*, 1937-1942.
- [89] Adli, A. D. F.; Jahanban-Esfahlan, R.; Seidi, K.; Samandari-Rad, S.; Zarghami, N. *Chem. Biol. Drug Des.* **2018**, 1-12.
- [90] Daniel Prantner, D. J. P., Wendy Lai, Mark S. Williams, Shruti Sharma, Katherine A. Fitzgerald, and Stefanie N. Vogel *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 39776-39788.
- [91] Gao, P.; Ascano, M.; Zillinger, T.; Wang, W.; Dai, P.; Serganov, Artem A.; Gaffney, Barbara L.; Shuman, S.; Jones, Roger A.; Deng, L.; Hartmann, G.; Barchet, W.; Tuschl, T.; Patel, Dinshaw J. *Cell* **2013**, *154*, 748-762.
- [92] Cavlar, T.; Deimling, T.; Ablasser, A.; Hopfner, K. P.; Hornung, V. *The EMBO Journal* **2013**, *32*, 1440-1450.
- [93] Cui, X.; Zhang, R.; Cen, S.; Zhou, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *182*, 111591.
- [94] Sintim, H. O.; Mikek, C. G.; Wang, M.; Soreshjani, M. A. *MedChemComm* **2019**, *10*, 1999-2023.
- [95] Ramanjulu, J. M.; Pesiridis, G. S.; Yang, J.; Concha, N.; Singhaus, R.; Zhang, S.-Y.; Tran, J.-L.; Moore, P.; Lehmann, S.; Eberl, H. C.; Muelbauer, M.; Schneck, J. L.; Clemens, J.; Adam, M.; Mehlmann, J.; Romano, J.; Morales, A.; Kang, J.; Leister, L.; Graybill, T. L.; Charnley, A. K.; Ye, G.; Nevins, N.; Behnia, K.; Wolf, A. I.; Kasparcova, V.; Nurse, K.; Wang, L.; Li, Y.; Klein, M.; Hopson, C. B.; Guss, J.; Bantscheff, M.; Bergamini, G.; Reilly, M. A.; Lian, Y.; Duffy, K. J.; Adams, J.; Foley, K. P.; Gough, P. J.; Marquis, R. W.; Smothers, J.; Hoos, A.; Bertin, J. *Nature* **2018**, *564*, 439-443.
- [96] Siu, T.; Altman, M. D.; Baltus, G. A.; Childers, M.; Ellis, J. M.; Gunaydin, H.; Hatch, H.; Ho, T.; Jewell, J.; Lacey, B. M.; Lesburg, C. A.; Pan, B.-S.; Sauvagnat, B.; Schroeder, G. K.; Xu, S. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 92-97.
- [97] Haag, S. M.; Gulen, M. F.; Reymond, L.; Gibelin, A.; Abrami, L.; Decout, A.; Heymann, M.; van der Goot, F. G.; Turcatti, G.; Behrendt, R.; Ablasser, A. *Nature* **2018**, *559*, 269-273.

- [98] Mukai, K.; Konno, H.; Akiba, T.; Uemura, T.; Waguri, S.; Kobayashi, T.; Barber, G. N.; Arai, H.; Taguchi, T. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11932.
- [99] Hansen, A. L.; Mukai, K.; Schopfer, F. J.; Taguchi, T.; Holm, C. K. *Cell. Mol. Immun.* **2019**, *16*, 236-241.
- [100] Vincent, J.; Adura, C.; Gao, P.; Luz, A.; Lama, L.; Asano, Y.; Okamoto, R.; Imaeda, T.; Aida, J.; Rothamel, K.; Gogakos, T.; Steinberg, J.; Reasoner, S.; Aso, K.; Tuschl, T.; Patel, D. J.; Glickman, J. F.; Ascano, M. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 750.
- [101] Baguley, B. C. *Lancet Oncol.* **2003**, *4*, 141-148.
- [102] McKeage, M. J.; Reck, M.; Jameson, M. B.; Rosenthal, M. A.; Gibbs, D.; Mainwaring, P. N.; Freitag, L.; Sullivan, R.; Von Pawel, J. *Lung Cancer* **2009**, *65*, 192-197.
- [103] McKeage, M. J.; Von Pawel, J.; Reck, M.; Jameson, M. B.; Rosenthal, M. A.; Sullivan, R.; Gibbs, D.; Mainwaring, P. N.; Serke, M.; Lafitte, J. J.; Chouaid, C.; Freitag, L.; Quoix, E. *Br. J. Canc.* **2008**, *99*, 2006-2012.
- [104] Daei Farshchi Adli, A.; Jahanban-Esfahlan, R.; Seidi, K.; Samandari-Rad, S.; Zarghami, N. *Chem. Biol. Drug Des.* **2018**, *91*, 996-1006.
- [105] Conlon, J.; Burdette, D. L.; Sharma, S.; Bhat, N.; Thompson, M.; Jiang, Z.; Rathinam, V. A. K.; Monks, B.; Jin, T.; Xiao, T. S.; Vogel, S. N.; Vance, R. E.; Fitzgerald, K. A. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 5216-5225.
- [106] Gao, P.; Zillinger, T.; Wang, W.; Ascano, M.; Dai, P.; Hartmann, G.; Tuschl, T.; Deng, L.; Barchet, W.; Patel, Dinshaw J. *Cell Rep.* **2014**, *8*, 1668-1676.
- [107] Che, X.; Du, X.-X.; Cai, X.; Zhang, J.; Xie, W. J.; Long, Z.; Ye, Z.-Y.; Zhang, H.; Yang, L.; Su, X.-D.; Gao, Y. Q. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 2073-2082.
- [108] Hwang, J.; Kang, T.; Lee, J.; Choi, B.-S.; Han, S. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 1869-1874.
- [109] Hou, S.; Lan, X.-j.; Li, W.; Yan, X.-l.; Chang, J.-j.; Yang, X.-h.; Sun, W.; Xiao, J.-h.; Li, S. *Bioorg. Chem.* **2020**, *95*, 103556.
- [110] Fujino, T.; Suzuki, T.; Okada, K.; Kogashi, K.; Yasumoto, K.-i.; Sogawa, K.; Isobe, H. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 8967-8976.
- [111] Fujino, T.; Yasumoto, K.; Yamazaki, N.; Hasome, A.; Sogawa, K.; Isobe, H. *Chem.-Asian J.* **2011**, *6*, 2956-2960.
- [112] Tom, E.-S. A. B. *Quarterly Reviews of Biophysics* **2015**, *48*, 429-436.
- [113] Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 633-696.
- [114] Demko, Z. P.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2110-2113.
- [115] Fujino, T.; Endo, K.; Yamazaki, N.; Isobe, H. *Chem. Lett.* **2012**, *41*, 403-405.
- [116] Caruthers, M. *Science* **1985**, *230*, 281-285.
- [117] Fujino, T.; Suzuki, T.; Okada, K.; Kogashi, K.; Yasumoto, K. I.; Sogawa, K.; Isobe, H. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 8967-8976.
- [118] El-Sagheer, A. H.; Brown, T. Q. *Rev. Biophys.* **2015**, *48*, 429-436.
- [119] Mutisya, D.; Selvam, C.; Kennedy, S. D.; Rozners, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3420-3422.
- [120] Berridge, M. J.; Lipp, P.; Bootman, M. D. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2000**, *1*, 11-21.
- [121] Fliegert, R.; Gasser, A.; Guse, A. H. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 109-114.

- [122] Swarbrick, J. M.; Graeff, R.; Garnham, C.; Thomas, M. P.; Galione, A.; Potter, B. V. L. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 2458-2461.
- [123] Fujino, T.; Okada, K.; Isobe, H. *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 2659-2661.
- [124] Rozners, E.; Xu, Q. *Org. Lett.* **2003**, 5, 3999-4001.
- [125] Kotikam, V.; Rozners, E. *Org. Lett.* **2017**, 19, 4122-4125.
- [126] Xu, Q.; Katkevica, D.; Rozners, E. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 5906-5913.
- [127] Peterson, M. A.; Nilsson, B. L.; Sarker, S.; Doboszewski, B.; Zhang, W.; Robins, M. J. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 8183-8192.
- [128] Pal, C.; Chakraborty, T. K. *J. Org. Chem.* **2017**, 6, 1421-1427.
- [129] Gaffney, B. L.; Jones, R. A. *Org. Lett.* **2014**, 16, 158-161.
- [130] Glick, G.; Ghosh, S.; Olhava, E. J.; Roush, W. R.; Jones, R. *Patent US2019/0345191 A1* **2017**, WO2017123657A1.
- [131] Opoku-Temeng, C.; Zhou, J.; Zheng, Y.; Su, J.; Sintim, H. O. *Chem. Commun.* **2016**, 52, 9327-9342.
- [132] Rao, J.; Dragulescu-Andrasi, A.; Yao, H. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, 18, 17-25.
- [133] Heilemann, M.; van de Linde, S.; Schüttelpelz, M.; Kasper, R.; Seefeldt, B.; Mukherjee, A.; Tinnefeld, P.; Sauer, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 6172-6176.
- [134] Xu, W.; Zeng, Z.; Jiang, J.-H.; Chang, Y.-T.; Yuan, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 13658-13699.
- [135] Zimmer, M. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 759-782.
- [136] Shaner, N. C.; Campbell, R. E.; Steinbach, P. A.; Giepmans, B. N. G.; Palmer, A. E.; Tsien, R. Y. *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 1567-1572.
- [137] Kapuscinski, J. *Biotech. Histochem.* **1995**, 70, 220-233.
- [138] Schäferling, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 3532-3554.
- [139] Wombacher, R.; Cornish, V. W. *J. Biophotonics* **2011**, 4, 391-402.
- [140] Jares-Erijman, E. A.; Jovin, T. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 409-416.
- [141] Jares-Erijman, E. A.; Jovin, T. M. *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1387-1395.
- [142] Westphal, M.; Jungbluth, A.; Heidecker, M.; Mühlbauer, B.; Heizer, C.; Schwartz, J.-M.; Marriott, G.; Gerisch, G. *Curr. Biol.* **1997**, 7, 176-183.
- [143] Ballestrem, C.; Wehrle-Haller, B.; Imhof, B. A. *J. Cell Sci.* **1998**, 111, 1649-1658.
- [144] *Biolog Life Science Institute GmbH & Co. KG* **2015**, <https://www.biolog.de/c-digmp-and-c-diamp-analogues/cgamp-analogues> (aufgerufen am 15.03.2020).
- [145] Heil, K.; Pearson, D.; Carell, T. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 4271-4278.
- [146] Kawaguchi, M.; Han, X.; Hisada, T.; Nishikawa, S.; Kano, K.; Ieda, N.; Aoki, J.; Toyama, T.; Nakagawa, H. *J. Med. Chem.* **2019**, 62, 9254-9269.
- [147] Sharma, M.; Thode, T.; Weston, A.; Kaadige, M. R. *Int. J. Cell. Sci. Mol. Biol.* **2018**, 5, 1-5.
- [148] Sinkeldam, R. W.; Greco, N. J.; Tor, Y. *Chem. Rev.* **2010**, 110, 2579-2619.
- [149] Xu, W.; Chan, K. M.; Kool, E. T. *Nat. Chem.* **2017**, 9, 1043-1055.
- [150] Shin, D.; Sinkeldam, R. W.; Tor, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 14912-14915.
- [151] Rovira, A. R.; Fin, A.; Tor, Y. *Chem. Sci.* **2017**, 8, 2983-2993.

- [152] Roembke, B. T.; Zhou, J.; Zheng, Y.; Sayre, D.; Lizardo, A.; Bernard, L.; Sintim, H. O. *Mol. Biosyst.* **2014**, *10*, 1568-1575.
- [153] Meehan, R. E.; Torgerson, C. D.; Gaffney, B. L.; Jones, R. A.; Strobel, S. A. *Biochemistry* **2016**, *55*, 837-849.
- [154] Andreeva, L.; Hiller, B.; Kostrewa, D.; Lässig, C.; de Oliveira Mann, C. C.; Jan Drexler, D.; Maiser, A.; Gaidt, M.; Leonhardt, H.; Hornung, V.; Hopfner, K.-P. *Nature* **2017**, *549*, 394-398.
- [155] Novotná, B.; Vaneková, L.; Zavřel, M.; Buděšínský, M.; Dejmek, M.; Smola, M.; Gutten, O.; Tehrani, Z. A.; Pimková Polidarová, M.; Brázdová, A.; Liboska, R.; Štěpánek, I.; Vavrina, Z.; Jandušík, T.; Nencka, R.; Rulíšek, L.; Bouřa, E.; Brynda, J.; Páv, O.; Birkus, G. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 10676-10690.
- [156] Lipinski, C. A. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2000**, *44*, 235-249.
- [157] Di, L.; Kerns, E. H.; Carter, G. T. *Curr. Pharm. Des.* **2009**, *15*, 2184-2194.
- [158] N., W. J.; Younjin, C.; Samuel, T.; Andrea, C.; T., K. E. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 279-285.
- [159] Mutisya, D.; Selvam, C.; Lunstad, B. D.; Pallan, P. S.; Haas, A.; Leake, D.; Egli, M.; Rozners, E. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 6542-6551.
- [160] Arzel, L.; Dubreuil, D.; Dénès, F.; Silvestre, V.; Mathé-Allainmat, M.; Lebreton, J. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 10742-10758.
- [161] Kinzie, C. R.; Steele, A. D.; Pasciolla, S. M.; Wuest, W. M. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 4966-4968.
- [162] Horne, W. S.; Olsen, C. A.; Beierle, J. M.; Montero, A.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4718-4724.
- [163] Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis* **2006**, 16-366.
- [164] Kitov, P. I.; Bundle, D. R. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2835-2838.
- [165] Tsukamoto, H.; Suzuki, T.; Kondo, Y. *Synlett* **2007**, *2007*, 3131-3136.
- [166] Zhu, X.-F.; Scott, A. I. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20*, 197-211.
- [167] Sawada, D.; Kanai, M.; Shibasaki, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10521-10532.
- [168] Meng, D.; Bertinato, P.; Balog, A.; Su, D.-S.; Kamenecka, T.; Sorensen, E. J.; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10073-10092.
- [169] Zhu, X.-F.; Williams, H. J.; Ian Scott, A. *Synth. Commun.* **2003**, *33*, 1233-1243.
- [170] Reddy, P. M.; Bruice, T. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1281-1285.
- [171] Dialer, C. R.; Stazzoni, S.; Drexler, D. J.; Müller, F. M.; Veth, S.; Pichler, A.; Okamura, H.; Witte, G.; Hopfner, K.-P.; Carell, T. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 2089-2095.
- [172] Rapino, F.; Robles, Eloy F.; Richter-Larrea, Jose A.; Kallin, Eric M.; Martinez-Climent, Jose A.; Graf, T. *Cell Rep.* **2013**, *3*, 1153-1163.
- [173] Gaidt, M. M.; Rapino, F.; Graf, T.; Hornung, V. In *Innate Immune Activation: Methods and Protocols*; De Nardo, D., De Nardo, C. M., Eds.; Springer New York: New York, NY, **2018**, p 57-66.
- [174] Greulich, W.; Wagner, M.; Gaidt, M. M.; Stafford, C.; Cheng, Y.; Linder, A.; Carell, T.; Hornung, V. *Cell* **2019**, *179*, 1264-1275.e1213.
- [175] Dockrell, D. H.; Kinghorn, G. R. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *48*, 751-755.
- [176] Park, B. S.; Song, D. H.; Kim, H. M.; Choi, B.-S.; Lee, H.; Lee, J.-O. *Nature* **2009**, *458*, 1191-1195.
- [177] Rovira, A. R.; Fin, A.; Tor, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 15556-15559.

- [178] Feldmann, J.; Li, Y.; Tor, Y. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 4379-4389.
- [179] Ching, S. M.; Tan, W. J.; Chua, K. L.; Lam, Y. *Biorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 6657-6665.
- [180] Diner, Elie J.; Burdette, Dara L.; Wilson, Stephen C.; Monroe, Kathryn M.; Kellenberger, Colleen A.; Hyodo, M.; Hayakawa, Y.; Hammond, Ming C.; Vance, Russell E. *Cell Rep.* **2013**, *3*, 1355-1361.
- [181] Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- [182] Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.
- [183] Webber, M. J.; Warren, S. A.; Grainger, D. M.; Weston, M.; Clark, S.; Woodhead, S. J.; Powell, L.; Stokes, S.; Alanine, A.; Stonehouse, J. P.; Frampton, C. S.; White, A. J. P.; Spivey, A. C. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2514-2533.
- [184] Jenny, T. F.; Schneider, K. C.; Benner, S. A. *Nucleos. Nucleot.* **1992**, *11*, 1257-1261.
- [185] Robins, M. J.; Zou, R.; Guo, Z.; Wnuk, S. F. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9207-9212.
- [186] Patil, N. T.; John, S.; Sabharwal, S. G.; Dhavale, D. D. *Biorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2155-2160.

